

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität

Frankfurt am Main

Medizinische Klinik IV

Schwerpunkt: Kardiologie und Nephrologie

Direktor: Prof. Dr. med. A. Zeiher

Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung,
proximaler und distaler Tubuluszellen der
menschlichen Niere

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs der Medizin der
Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Anita Balser-Kutt
aus Gießen/Rödgen

Frankfurt am Main

1999

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. J. E. Scherberich

Koreferent: PD Dr. J. Binder

Mündliche Prüfung: 13.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	Seite	1
1.1	Einleitung	Seite	1
1.2	Morphologie der Niere	Seite	3
1.2.1	Das Nephron	Seite	3
1.2.2	Nierenkörperchen	Seite	3
1.2.3	Proximaler Tubulus	Seite	4
1.2.4	Henle'sche Schleife	Seite	4
1.2.5	Distaler Tubulus	Seite	5
1.2.6	Sammelrohr	Seite	5
1.3	Fragestellung	Seite	7
2	Material	Seite	8
2.1	Geräte und Zubehör	Seite	8
2.2	Verbrauchsmaterial	Seite	9
2.3	Reagenzien	Seite	10
2.3.1	Chemikalien, Lösungen, Medien, Enzyme, Antikörper	Seite	10
3	Methoden	Seite	13
3.1	Nierengewebe	Seite	13
3.2	Isolationsmethoden	Seite	13
3.2.1	Enzymatische Verdauung	Seite	13
3.3	Separationsmethode	Seite	14
3.3.1	Primärantikörper	Seite	14
3.3.1.1	Inkubation mit dem Primärantikörper	Seite	15
3.3.2	Percoll Dichtegrad	Seite	15
3.3.2.1	Herstellung der Percoll-Lösung	Seite	16
3.3.3	Methode A (Antikörper-Platten)	Seite	17
3.3.3.1	Herstellung des Kopplungspuffers	Seite	17
3.3.3.2	Vorbereitung der Platten	Seite	17
3.3.3.3	Methode	Seite	18

3.3.4	Methode B (Dynabeads)	Seite	19
3.3.4.1	Waschen der Dynabeads	Seite	19
3.3.4.2	Methode	Seite	20
3.3.4.3	Ablösung der Dynabeads	Seite	21
3.3.5	Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)	Seite	22
3.3.5.1	Herstellung des MACS-Puffers	Seite	22
3.3.5.2	Methode	Seite	22
3.4	Zellzahl und Vitalität	Seite	25
3.5	Zellkultivierung	Seite	25
3.5.1	Kulturmedium und Zusätze	Seite	25
3.5.2	Mediumwechsel	Seite	26
3.5.3	Zellablösung	Seite	26
3.5.3.1	Zellablösung mit PERF	Seite	26
3.5.3.2	Zellablösung mit Trypsin/EDTA	Seite	27
3.6	Zellcharakterisierung	Seite	27
3.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz	Seite	27
3.6.2	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	28
3.6.3	Immunhistochemie	Seite	30
3.6.4	Einbettung und Elektronenmikroskopie	Seite	30
4	Ergebnisse	Seite	31
4.1	Nierengewebe	Seite	31
4.2	Isolationsmethoden	Seite	31
4.2.1	Enzymatische Andauung	Seite	31
4.2.1.1	Anzahl lebender Zellen pro Nierengewebe bei unterschiedlicher enzymatischer Andauung	Seite	32
4.3	Separationsmethoden	Seite	33
4.3.1	Inkubation mit dem Primärantikörper	Seite	33
4.3.2	Percoll Dichtegradient	Seite	33
4.3.3	Methode A (Antikörper-Platten)	Seite	35
4.3.4	Methode B (Dynabeads)	Seite	36
4.3.5	Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)	Seite	36
4.4	Zellkultivierung	Seite	36

4.5	Zellcharakterisierung	Seite	42
4.5.1	Indirekte Immunfluoreszenz	Seite	42
4.5.2	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	42
4.5.2.1	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	43
4.5.3	Immunhistochemie	Seite	44
4.5.3.1	Immunhistochemische Bestimmung proximaler und distaler Tubuluszellen nach elf Tagen Kultivierung auf einer 96-Well-Platte. Extinktionsmessung bei unterschiedlicher Zellzahl nach Enzymfärbung.	Seite	45
4.5.4	Einbettung und Elektronenmikroskopie	Seite	50
5	Diskussion	Seite	51
6	Zusammenfassung	Seite	59
7	Literaturverzeichnis	Seite	61
8	Abbildung	Seite	66
9	Danksagung	Seite	68
10	Lebenslauf	Seite	69
11	Ehrenwörtliche Erklärung	Seite	70

1	Einleitung und Fragestellung	Seite	1
1.1	Einleitung	Seite	1
1.2	Morphologie der Niere	Seite	3
1.2.1	Das Nephron	Seite	3
1.2.2	Nierenkörperchen	Seite	3
1.2.3	Proximaler Tubulus	Seite	4
1.2.4	Henschle Schleife	Seite	4
1.2.5	Distaler Tubulus	Seite	5
1.2.6	Sammelrohr	Seite	5
1.3	Fragestellung	Seite	6

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Die Niere besitzt eine Reihe von Funktionen, die es ihr ermöglichen, ihre vielfältigen Aufgaben im Organismus zu erfüllen. Dazu gehört:

- Die Klärfunktion mit Absonderung harnpflichtiger Substanzen aus dem Blut, vor allem stickstoffhaltiger Endprodukte des Eiweißstoffwechsels, (z.B. Harnstoff, Harnsäure) und des Muskelstoffwechsels (Kreatinin), aber auch die Ausscheidung nichtmetabolisierbarer Substanzen (z.B. Medikamente). Gleichzeitig werden aber für den Organismus notwendige Blutbestandteile (z.B. Glukose, Aminosäuren) rückresorbiert.
- Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Durch Resorption und Sekretion von Wasser und Elektrolyten wird ein relativ konstantes Ionenmilieu im Körper aufrechterhalten.
- Die Regulation des Säure- und Basenhaushalts. Durch Sezernierung von Wasserstoffionen, Bikarbonatresorption, Ausscheidung titrierbarer Säure, und Ammoniaksekretion wird der pH-Wert des Blutes in seinem engen Bereich von 7,34-7,35 konstant gehalten.
- Die Bildung von Hormonen. In der Niere werden zwei Hormone (Gewebshormone) gebildet, das Renin und das Erythropoeitin. Damit nimmt die Niere Einfluß auf den Blutdruck (Renin); und die Blutbildung (Erythropoeitin). Außerdem wird in der Niere durch Hydroxilierung die aktive Form des Vitamin D gebildet, welches die Osteogenese stimuliert, und damit Einfluß auf den Knochenstoffwechsel hat.
- Die Stoffwechselfunktion mit dem Abbau niedermolekularer Plasmaproteine (β_2 -Mikroglobulin, Lysozym) und Peptidhormone (Parathormon, Insulin), die Glukoneogenese und Argininbildung.
- Die Niere als Erfolgsorgan extrarenal gebildeter Hormone (Aldosteron, atriales natriuretisches Peptid, Kalzitinin, Katecholamine, Parathormon, Vasopressin).

Die Niere ist durch die Fähigkeit zur Harnkonzentrierung in der Lage, die endogen gebildeten Stoffe mit nur ca. 1,5 l Harn pro Tag auszuschcheiden. Voraussetzung für eine hohe glomeruläre Filtrationsrate, d.h. für die Bildung des Primärharnes ist die hohe Durchblutung der Nierenrinde. Täglich werden ca. 170 l Primärharn in den Glomerula produziert. Davon gelangen 1-2 l Urin zur Ausscheidung. Die Rückresorption des Primärharnes erfolgt zu 65% im proximalen Tubulus, hier wird auch die größte Menge an Elektrolyten (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{2-} , SO_4^{2-}) und anderen Substanzen, z.B. Harnstoff, Aminosäuren, Glukose resorbiert. Im absteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife werden 20% und im distalen Tubulus und im Sammelrohr 10-15% des Primärharnes rückresorbiert. Hier erfolgt die endgültige Zusammensetzung des Endharns.

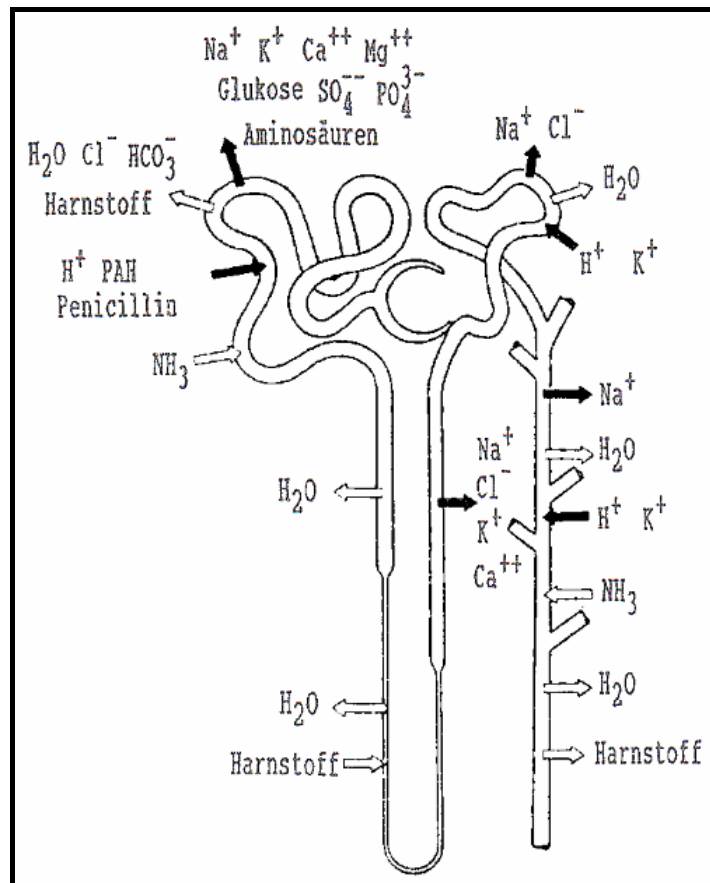


Abb. 1:
Übersicht über den
Stofftransport im Tubulus und
im Sammelrohr. Schwarze
Pfeile bedeuten aktiven, nicht
ausgefüllte Pfeile passiven
Transport.

1.2 Morphologie der Niere

Nieren sind paarig angelegte Organe welche beiderseits der Wirbelsäule, unterhalb des Zwerchfells zwischen Bauchfell (Peritoneum) und hinterer Bauchwand liegen. Ihre Form kann als bohnenförmig beschrieben werden, wobei der konvexe Rand nach lateral, die konkave Krümmung nach medial zeigt. An der konkaven Seite befindet sich der Hilus durch welchen die Nierenarterie, Nierenvene, Ureter, Lymphgefäße und Nerven ein bzw. austreten. Die Niere des Erwachsenen ist 10-12 cm lang, 2,5 cm dick, 5 cm breit und wiegt zwischen 120 und 170 Gramm.

Bereits mit bloßem Auge ist auf Längs- und Querschnitten eine Gliederung in zwei Schichten erkennbar. Die äußere Rindenschicht (Cortex renis) liegt zwischen der Basis der Pyramiden und der fibrösen Kapsel und setzt sich hiluswärts als Säulen der Rindensubstanz (Columnae renales) zwischen den Pyramiden fort. Die innere Markschrift (Medulla renis) besteht aus 16-20 Pyramiden (Pyramides renales), deren Spitzen (Papillae renales) in die Kelche (Calices) des Nierenbeckens (Pelvis renalis) ragen.

1.2.1 Das Nephron

Funktionelle Baueinheit der Niere ist das Nephron, es besteht aus Nierenkörperchen (Corpuscula renis), Nierenkanälchen (Tubuli renales) und dem Sammelrohr. Jede menschliche Niere besteht aus etwa 1 bis 1.2 Millionen Nephrone.

1.2.2 Nierenkörperchen

Das Nierenkörperchen besteht aus dem Kapillarknäuel (Glomerulus) welches von einer zweiblättrigen Epithelkapsel (Bowmannsche Kapsel) umgeben ist. Das Glomerulum ist ein Knäuel von 20-40 Kapillaren, hier wird das Blut filtrierte. Über das Vas afferens wird dem Glomerulum das Blut zugeführt. Es wird durch die sich aufzweigenden

Kapillarschlingen geleitet und gelangt zur abführenden Arteriole dem Vas efferens. Vas afferens und Vas efferens bilden den Gefäßpol des Nierenkörperchens. Dem Gefäßpol gegenüber liegt der Harnpol. Am Harnpol geht das parietale Blatt der Bowmannschen Kapsel über in den proximalen Tubulus. Der Harnpol ist somit der Beginn des Tubulus.

1.2.3 Proximaler Tubulus

Der proximale Tubulus besteht aus einem gewundenen Teil (Pars contorta) und einem geraden Teil (Pars recta). Dieser gerade Teil wird auch als dickes Segment des absteigenden Henle-Schenkels bezeichnet.

Lichtmikroskopisch zeigt sich das proximale Segment im Querschnitt rund oder oval. Der Durchmesser des proximalen Tubulus beträgt 40-60 µm. Das unregelmäßig geformte Lumen in der Mitte wird von einer einfachen kubischen Epithelzellschicht umgeben. Die Zellen des Tubulus haben ein granuliertes Zytoplasma, zahlreiche in radiären Reihen angeordnete Mitochondrien, und oft mehrere Zellkerne. Die dem Lumen zugewandte Zelloberfläche zeigt einen Bürstensaum, welcher aus zahlreichen Mikrovilli besteht. Benachbarte Zellen sind durch laterale und basale Zellfortsätze (basales Labyrinth) miteinander verzahnt. Beides bewirkt eine bedeutende Vergrößerung sowohl der dem Lumen zugewandten als auch der dem Lumen abgewandten Oberfläche. Von einem Schlußleistenkomplex werden die Zellen zusammengehalten. Er hält die Zellen am Lumen in engem Kontakt. Der Schlußleistenkomplex besteht aus einem dem Lumen zugewandten oberflächlichen Teil, der Zonula occludens. Hier verschmelzen die benachbarten Zellmembranen miteinander. Darunter liegt die Zonula adhaerens, in welcher ein Interzellularspalt besteht. Die Zonula occludens verhindert das Stoffe aus dem Tubuluslumen zwischen die Tubuluszellen entweichen.

1.2.4 Henle'sche Schleife

Die Henle'sche Schleife wird gebildet aus einem dicken absteigenden Teil, einem dünnen absteigenden und einem dünnen aufsteigenden und einem dicken aufsteigenden Teil. Der dicke absteigende Abschnitt der Henle'schen Schleife wird auch als Pars recta des proximalen Tubulussystems bezeichnet. Der dicke aufsteigende Abschnitt der Henle'schen Schleife wird auch als Pars recta des distalen Tubulussystems bezeichnet.

Die dünnen absteigenden, die dünnen und die dicken aufsteigenden Schenkel werden von einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Der dichte Bürstensaum des proximalen Tubulus wird hier von wenigen, sehr kurzen Mikrovilli ersetzt. Besonders der dünne aufsteigende Teil besitzt viele sich verzahnende Fortsätze zu anderen Zellen. Beide Schenkel der Nephronschleife zeigen im lichtmikroskopischen Bild einen runden Querschnitt. Auch die Zellen der Henle'schen Schleife haften mit Schlußleisten aneinander.

1.2.5 Distaler Tubulus

Der distale Tubulus wird in zwei Abschnitte unterteilt. In einen ersten, geraden Teil (Pars recta) und einen zweiten, gewundenen Teil (Pars contorta). Lichtmikroskopisch zeigt der distale Tubulus im Querschnitt eine weitere und klarer begrenzte Lichtung als der proximale Tubulus. Wegen der kleineren Zellen sieht man „mehr“ Zellkerne. Der dichte Bürstensaum des proximalen Tubulus fehlt, lediglich ein paar kleine kurze Mikrovilli sind zu sehen. Oft ist im geraden Teil (Pars recta) eine Basalstreifung erkennbar, die durch eng nebeneinander liegende stäbchenförmige Mitochondrien entsteht. Im Gegensatz dazu sind im apikalen Zellteil die nicht sehr reichlichen Mitochondrien rund oder oval. Die basale Zellfläche des geraden Teils hat tiefe Einfaltungen, und lateral erreicht die Verzahnung benachbarter Zellen ein noch größeres Ausmaß als bei den Zellen des proximalen Tubulus. Im gewundenen Teil (Pars contorta) nimmt die Zahl der Mitochondrien ab, dadurch entfällt hier die Basalstreifung. Lediglich ein paar runde oder ovale Mitochondrien sind zu sehen. Die Einfaltungen der basalen Plasmamembran sind weniger tief oder sogar nicht vorhanden. Auch laterale Zellverzahnungen sind selten.

1.2.6 Sammelrohr

Im Sammelrohr wird der Harn zur Papillenspitze geleitet. Jedes Sammelrohr hat mehrere Zuflüsse aus benachbarten Nephronen. Die Sammelrohre vereinigen sich spitzwinklig zu größeren Rohren, die schließlich in der Pyramidenspitze in die Nierenkelche münden. Die durchschnittliche Länge der Sammelrohre beträgt 22 mm. Im histologischen Bild sind die Sammelrohre leicht auffindbar, da ihre Zellen einen runden, zentralen Kern und ein helles Zytoplasma besitzen. Im mikroskopischen

Querschnitt besitzt das Sammelrohr das weiteste Lumen des Tubulusapparates. Im Verlauf des Sammelrohrs ändert sich die Zellhöhe. Sie ist in der Rinde nieder kubisch, im Mark kubisch und gegen die Papillenspitze zylindrisch. Am Lumen werden die Sammelrohrzellen alle durch Schlußleistenkomplexe am oberen Rand zusammengehalten. Als zusätzliches Hafelement können die Zylinderzellen der Papillargänge Desmosomen aufweisen.

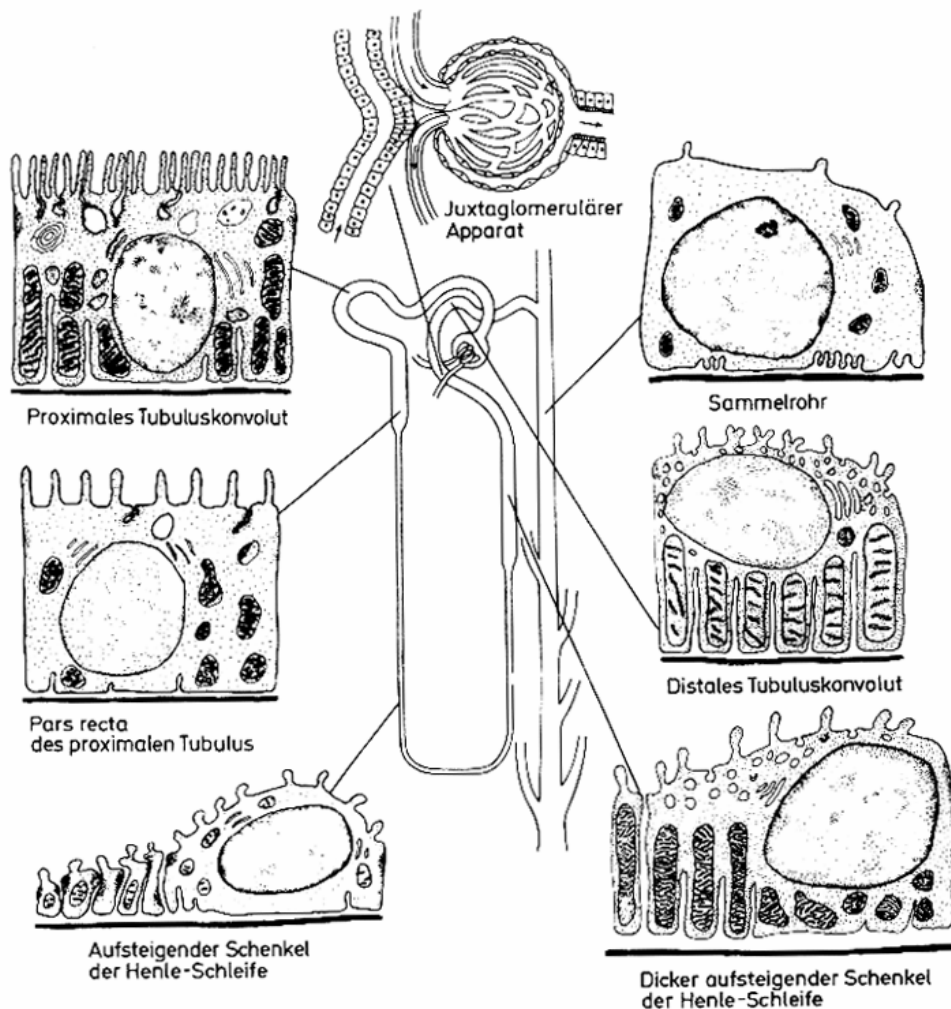


Abb. 2:

Grafische Darstellung von einigen der ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den größeren Abschnitten des Nephrons. Außerdem ist der juxtaglomeruläre Apparat dargestellt, der sich an dem Berührungspunkt zwischen distalem Tubulus und dem Gefäßpol des ihm zugehörigen Glomerulums befindet.

1.3 Fragestellung

Die Heterogenität und Komplexität des Nephrons stellt ein großes Problem für das Verständnis physiologischer wie pathologischer Nierenveränderungen dar.

Verschiedene Zellarten in der menschlichen Niere reagieren unterschiedlich auf schädigende Einflüsse. Durch genau definierte **in vitro** Systeme (z.B. Nierenzellkulturen) ist es möglich die Reaktion einzelner Nephronabschnitte oder sogar einzelner Zellpopulationen der menschlichen Niere zu analysieren. Dabei ermöglicht die Zellkultur die Aufteilung komplexer Fragestellungen in analysierbare Teilschritte. Dies ist besonders wichtig, da **in vivo** Experimente an der menschlichen Niere nur eingeschränkt möglich sind.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden zur **Isolierung und Kultivierung von Nierenzellen** entwickelt. Die jeweilige Isolationsmethode bestimmte dabei den Reinheitsgrad der Zellen. Van der Biest et al. (1994) isolierten mit Hilfe der Durchflußzytometrie reine proximale, und heterogene distale Tubuluszellen der menschlichen Niere. Anna L. Triffilis et al. (1984) isolierten humane Tubuluszellen durch mehrfaches Filtern einer homogenen Zellsuspension über unterschiedlich große Nylon-Siebe.

Ziel dieser Arbeit war es im Labor eine effektive Methode zur Isolierung und Kultivierung proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere aufzubauen und zu etablieren. Dabei wurde neben möglichst hoher Ausbeute und langer Kulturdauer auch besonderer Wert auf die Reinheit der Zellen gelegt.

Ausgangspunkt war die Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper in unserem Labor gegen nephronspezifische Abschnitte der Humanniere. Die Nierenzellen wurden so mit Hilfe eines immunomagnetischem Trenn- und Selektionsverfahrens isoliert, kultiviert und expandiert und waren Ausgangspunkt für weitere histologische, biochemische, enzymatische und ultrastrukturelle Untersuchungen.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

Deutsche Dynal GmbH, Hamburg:

Magnet: MPC-1

Sample Mixer

Heraeus, Hanau:

CO₂-Begasungsbrutschrank mit Gasmonitor

Laborzentrifuge: Megafuge 1.0 R

Sterile Werkbank: Lamin air HV 2448

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach:

MiniMACS Magnet-Separator

Stahlständer

Olympus, Hamburg:

Inversionsmikroskop CK2 mit Kamera OM-2-SP

Du Pont, Bad Homburg:

Ultrazentrifuge mit Aluminium Rotor SS-34

Zeiss, Unterkochen:

Forschungsmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung und Kamera

Zusätzlich wurden weitere laborübliche Geräte und Gebrauchsgegenstände wie Elisa-Reader, Mikrotom, pH-Meter, Wasserbad, Heizplatten, Analysenwaagen, Taumelgerät, Schüttler, Vortex, Bunsenbrenner, Stahlsiebe, Pinzetten, Scheren, Neubauer Zählkammer usw. verwendet.

2.2 Verbrauchsmaterial

Becton Dickinson, Heidelberg:

Sterile Einmal-Perfusionsspritzen (50 ml)

BIO-RAD, München:

Adhäsionsobjektträger

Falcon, Heidelberg:

Sterile Petrischalen

Sterile Pipetten

Sterile Zellschaber

Sterile Zentrifugenröhrchen

Feather Safety Razor Co., Köln:

Einmal-Skalpelle Nr. 10

Greiner, Solingen:

Zellkulturflaschen (25 ml)

Millipore, Molsheim France:

Sterilfilter Millex-HV 0.45 µm

Sterilfilter Millex-HV 0.22 µm

Nunc, Wiesbaden:

Chamber Slides

Kryoröhrchen

F96 Maxisorp Immuno-Platten

Multiwell Gewebe-Kultur-Platten

Zellkulturflaschen

Sorvall:

Zentrifugenröhrchen: Oak Ridge Bottles (Polycarbonat 50 ml mit Verschluß)

2.3 Reagenzien

2.3.1 Chemikalien, Lösungen, Medien, Enzyme, Antikörper

Boehringer Mannheim Biochemica:

ABTS-Tabletten

Collagenase/Dispase

Hyaluronidase

DNase I

Testkombination AP

Testkombination Gamma GT

Braun AG, Melsungen:

Aqua ad injectabilia (durch Zugabe von 23.3 g Na₂HPO₄, 3.45 g NaHPO₄,
81.8 g NaCl in 10 l Aqua ad injectabilia wurde PBS hergestellt)

Physiologische Kochsalzlösung

Dynal GmbH, Hamburg:

Dynabeads M-450 (Ratte anti-Maus IgG 1)

Dynabeads M-450 (Ratte anti-Maus IgG 2b)

Immunotech, Hamburg:

Monoklonaler Antikörper CD26

Monoklonaler Antikörper CD13

Jackson Immuno Research,:

Cy3-markierter polyklonaler Antikörper Ziege anti-Maus IgG + IgM

Life Technologies GmbH, Eggenstein:

Fetales Kälberserum (FCS)

HBSS Hanks` Balanced Salt Solution

Medium M199

Monoloner Antikörper, Klonotyp

MAK 5A2 (siehe 3.3.1), selbst hergestellt

Monoloner Antikörper, Klonotyp

MAK 138H11 (siehe 3.3.1), selbst hergestellt

Merck, Darmstadt:

APM-Substrat

Acetat-Pufferlösung

Chlorwasserstoff (0,1 mol/l)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Gelatine

Glucose

Glutaraldehyd

Hämatoxylin

Natriumcarbonat-10-hydrat (Na_2CO_3)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

Natriumhydrogenphosphat (NaHPO_4)

N,N-Dimethyl-Formamid

Perhydrol (H_2O_2)

Tris (hydroxymethyl) aminomethanhydrochlorid

Tween (Polyoxyethylensorbitaminolaurat)

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach:

Indirect Microbeads (Ratte-anti-Maus IgG1)

Indirect Microbeads (Ratte-anti-Maus IgG2a+b)

Pharmacia Biosystems GmbH, Freiburg:

Percoll

Density Marker Beads

Riedel-de-Haen, Seelze:

Natriumazid (NaN_3)

Roth, Karlsruhe:

Glycin

Hepes

Seromed, Berlin:

Collagenase Typ CLS IV

Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02%ig in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})

Sigma, Deisenhofen:

Bovines Serumalbumin (BSA)

DAP IV Substrat

Dulbecco`s modified Eagle`s medium/Ham`s F12 nutritional supplement
(1:1, DMEM/HF12; Sigma UK)

PBS-Puffer ohne Calcium und Magnesium

Trypan-Blau Lösung (0,4%)

3 Methoden **Seite 13**

3.1	Nierengewebe	Seite	13
3.2	Isolationsmethoden	Seite	13
3.2.1	Enzymatische Verdauung	Seite	13
3.3	Separationsmethode	Seite	14
3.3.1	Primärantikörper	Seite	14
3.3.1.1	Inkubation mit dem Primärantikörper	Seite	15
3.3.2	Percoll Dichtegrad	Seite	15
3.3.2.1	Herstellung der Percoll-Lösung	Seite	16
3.3.3	Methode A (Antikörper-Platten)	Seite	17
3.3.3.1	Herstellung des Kopplungspuffers	Seite	17
3.3.3.2	Vorbereitung der Platten	Seite	17
3.3.3.3	Methode	Seite	18
3.3.4	Methode B (Dynabeads)	Seite	19
3.3.4.1	Waschen der Dynabeads	Seite	19
3.3.4.2	Methode	Seite	20
3.3.4.3	Ablösung der Dynabeads	Seite	21
3.3.5	Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)	Seite	22
3.3.5.1	Herstellung des MACS-Puffers	Seite	22
3.3.5.2	Methode	Seite	22
3.4	Zellzahl und Vitalität	Seite	25
3.5	Zellkultivierung	Seite	25
3.5.1	Kulturmedium und Zusätze	Seite	25
3.5.2	Mediumwechsel	Seite	26
3.5.3	Zellablösung	Seite	26
3.5.3.1	Zellablösung mit PERF	Seite	26
3.5.3.2	Zellablösung mit Trypsin/EDTA	Seite	27
3.6	Zellcharakterisierung	Seite	27
3.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz	Seite	27
3.6.2	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	28
3.6.3	Immunhistochemie	Seite	30
3.6.4	Einbettung und Elektronenmikroskopie	Seite	30

3 Methoden

3.1 Nierengewebe

Humanes Nierengewebe stammte von Nephrektomien im Rahmen einer Tumorerkrankung (n=30). Im unmittelbaren Anschluß an die Organentnahme wurde ein keilförmiges Exzizat, welches überwiegend aus Nierenrinde bestand, im Operationssaal steril entnommen. Dieses Gewebstück wurde mit dem Skalpell entfernt, wobei darauf geachtet wurde, daß das Gewebstück frei von Tumoranteilen war. Das Gewicht des Gewebstückes betrug ca. 12-14 g. Nach Transport des Gewebes in sterilem, eiskaltem Medium M199 wurde es sofort in eine sterile Arbeitsbank überführt und weiter verarbeitet.

Hier wurde es in einer sterilen Petrischale mit eiskaltem Medium M199 beträufelt. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Pinzette die teilweise noch vorhandene Kapsel abgezogen. Eventuell vorhandenes Fettgewebe und größere Gefäße wurden entfernt. Dann wurde das Gewebstück mit einem Skalpell in kleine Stücke von ca. 1-3 mm³ geschnitten. Diese Suspension konnte mit einer 50ml Pipette aufgenommen und auf 4 Zentrifugenröhrchen a 50ml verteilt werden. Dann folgte Zentrifugation bei 128 g (800U/min) für 8 min. bei 10° C. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Es befand sich nun in jedem Zentrifugenröhrchen Nierengewebe von ca. 3-4 g.

3.2 Isolationsmethoden

3.2.1 Enzymatische Verdauung

Nachfolgend wurde nun das Nierengewebe in den Zentrifugenröhrchen einer enzymatischen Verdauung zugeführt. Dazu mußten verschiedene Enzymlösungen wie folgt vorbereitet werden.

Enzymlösung I

0,1% Collagenase IV (1mg/ml) und 0,01% DNase I (0,1mg/ml)

Beide Enzyme wurden in 100ml PBS gelöst. Außerdem wurde zur Aktivierung des Enzyms DNase I, Magnesium++-Ionen in einer Konzentration von 5 mmol/l zugegeben.

Enzymlösung II

0,1% Hyaluronidase (1mg/ml)

Dieses Enzym wurde in 100ml PBS gelöst.

Vor Gebrauch wurden beide Enzymlösungen *steril filtriert* durch einen Filter mit der Porengröße 0,45µm und auf 37°C in einem Wärmeschrank erwärmt.

In jedes Zentrifugenröhrchen wurde nun 25ml der Enzymlösung I (0,1% Collagenase IV + 0,1% DNase I) pipettiert. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen bei langsamer Rotation in einen Sample Mixer gestellt. Dieser Sample Mixer wurde bei 37°C für eine Stunde in einen Wärmeschrank gestellt.

Die Röhrchen wurden anschließend bei 1000 U/min und 10°C acht Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 25 ml HBSS resuspendiert. Dieser Schritt wurde, um die Zellsuspension von der *Enzymlösung I* zu reinigen, noch einmal wiederholt. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde in der *Enzymlösung II* resuspendiert. Anschließend wurden wieder die Röhrchen bei langsamer Rotation in den Sample Mixer gestellt und bei 37°C eine Stunde im Wärmeschrank inkubiert.

Nach dem Einwirken dieser zweiten Enzymlösung wurde die Zellsuspension sofort über ein *Stahlsieb* mit der Porengröße 120 µm gegeben. Dadurch wurden größere Zellverbände aus der Suspension entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension dreimal in HBSS gewaschen. Das Pellet wurde in 5ml angesetztem DMEM Medium ohne HFCS (siehe Seite 25) resuspendiert.

3.3 Separationsmethoden

3.3.1 Primärantikörper

Als Primärantikörper wurden zwei in unserem Labor hergestellte monoklonale Antikörper verwendet. Zur Isolierung *proximaler* Tubuluszellen verwendeten wir den *monoklonalen Antikörper 138H11*. Er gehört der Immunglobulin Subklasse IgG₁ an. Dieser MAK ist gegen das Enzym Gamma-Glutamyltranspeptidase gerichtet, welches ein Bestandteil eines Multienzymkomplexes darstellt, der im peripheren Zytoskelett des Bürstensaumes im proximalen Tubulus (Scherberich et al. 1984) lokalisiert ist. Zur Isolierung *distaler* Tubuluszellen wurde der *monoklonale Antikörper 5A2* verwendet. Er gehört der Immunglobulin Subklasse IgG_{2b} an. Dieser MAK ist gegen

das Tamm-Horsfall-Protein (Uromodulin) gerichtet. Das Tamm-Horsfall-Protein ist ein hochmolekulares Glykoprotein. Es ist lokalisiert im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und im distalen Tubulus (Sikri et al.), hier vor allem in den Plasmamembranen der luminalen Seite.

3.3.1.1 Inkubation mit dem Primärantikörper

Das bisher in 50 ml großen Zentrifugenröhrchen resuspendierte Pellet wurde jetzt in 15 ml große Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die vier Zentrifugenröhrchen wurden nun aufgeteilt. Zwei für die Inkubation mit dem MAK 138H11 (Röhrchen 1 und 2), und zwei für die Inkubation mit dem MAK 5A2 (Röhrchen 3 und 4).

In die Röhrchen 1 und 2 wurde nun, zu dem in 5ml angesetztem DMEM Medium resuspendierten Pellet jeweils 100 µl des MAK 138H11 pipettiert. In die Röhrchen 3 und 4 wurde jeweils 100 µl des MAK 5A2 pipettiert. Anschließend wurden alle vier Röhrchen bei langsamer Rotation im „Sample Mixer“ für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen bei 128 g (800 U/min) 8 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen. Das Pellet wurde nun in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

3.3.2 Percoll Dichtegradient

Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine seit Jahren etablierte Methode um Zellen, Viren, und subzelluläre Partikel zu separieren. Percoll Medium ist ein Kieselgel-Kolloid mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) Beschichtung. Der Dichtegradient bildet sich dabei nach Zentrifugation im Festwinkelrotor innerhalb von 20-40 Minuten selbständig aus. Der Dichtebereich von Percoll liegt zwischen 1,0-1,3 g/ml, und ist als Ausgangsdichte frei wählbar. Um die einzelnen Dichtebereiche zu erkennen, wurde ein separates Röhrchen mit „Marker Beads“ mitgeführt.

Da der Dichtebereich der Tubuluszellen zwischen 1,045 g/ml und 1,07 g/ml liegt, (van der Biest et al. 1994) wurde die Ausgangsdichte auf 1,07 g/ml eingestellt. Damit wurde ein Dichtebereich von 1,0-1,1 g/ml abgedeckt.

3.3.2.1 Herstellung der Percoll-Lösung

Um 100 ml einer Percoll-Lösung mit der Ausgangsdichte 1,07 g/ml herzustellen wurden benötigt:

10,0 ml	1,5 molare NaCl-Lösung (wurde vor Gebrauch steril filtriert)
+ 49,2 ml	Percoll mit der Dichte 1,130 g/ml (steril)
+ 40,8 ml	Aqua bidest. (steril)
<hr/>	
= 100,0 ml	Percoll Lösung der Dichte 1,07 g/ml

Von der hergestellten Percoll Lösung wurden jeweils 30 ml auf die für die Ultrazentrifuge geeigneten Zentrifugenröhrchen verteilt. Da der Anteil der Zellsuspension maximal 20 % des Anteils von Percoll in der hergestellten Percoll-Lösung sein darf, durfte der Anteil der Zellsuspension nicht größer sein als 2,952 ml. (Der Anteil von Percoll in 30 ml der hergestellten Percoll-Lösung beträgt 14,76 ml davon 20% = 2,952 ml.) Da die Zellen in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung nach enzymatischer Verdauung und Primärantikörper-Inkubation vorlagen, wurden sie so auf die 30 ml Percoll-Lösung aufpipettiert. In das separat mitgeführte Röhrchen für die „Marker-Beads“ wurde ebenfalls 30 ml der hergestellten Percoll-Lösung pipettiert. Außerdem wurden „Marker Beads“ mit sieben unterschiedlichen Dichtegraden, die im Dichtebereich von 1,0-1,1 g/ml lagen auf die Percoll-Lösung pipettiert. Es wurden 100 µl von jedem „Marker Bead“ und noch 2,2 ml physiologische NaCl dazu pipettiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation aller Röhrchen bei 25.000 g (14.500 U/min) für 30 Minuten bei 4°C, in einer Ultrazentrifuge mit Festwinkelrotor. Nach der Zentrifugation wurde anhand der Marker Beads eine Eichkurve erstellt. Bei den Röhrchen, die die Zellsuspensionen enthielten, wurde der Dichtebereich zwischen 1,045 g/ml und 1,07 g/ml vorsichtig abpipettiert. Die Röhrchen wurden mit physiologischer NaCl aufgefüllt, vorsichtig gemischt und anschließend bei 128 g (800 U/min) für 8 Minuten bei 10°C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang mit physiologischer Kochsalzlösung wurde dreimal wiederholt um die Percoll-Lösung vollständig zu entfernen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet nach der jeweiligen Separationsmethode unterschiedlich weiterverarbeitet.

3.3.3 Methode A (Antikörper-Platten)

Bei dieser Methode wurde die Zellsuspension ohne Inkubation mit dem Primärantikörper, also direkt nach der enzymatischen Verdauung und der Percoll Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Hierfür wurde das Pellet nach der letzten Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes in 10 ml Medium M 199 resuspendiert. Als Separationsmethode wurde hier, mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Petrischalen verwendet. Zur Beschichtung der Petrischalen wurden die zwei, in unserem Labor hergestellten monoklonalen Antikörper verwendet. Für die Platten wurde zur Separation von proximalen Tubuluszellen der gegen das Enzym Gamma-Glutamyltranspeptidase gerichtete monoklonale Antikörper 138H11 benutzt. Zur Separation von distalen Tubuluszellen wurde, der gegen das Tamm-Horsfall-Protein (Uromodulin) gerichtete monoklonale Antikörper 5A2 benutzt.

3.3.3.1 Herstellung des Kopplungspuffers

Der Kopplungspuffer bestand zu acht Teilen aus 0,2 M NaHCO_3 (Na-Nitrogencarbonat) und zu siebzehn Teilen aus Na_2CO_3 (Natriumcarbonat). Der pH-Wert der Lösung betrug 10,6. Zur Herstellung des Kopplungspuffers wurden verwendet : 1,68 g NaHCO_3 (Mol = 84 g) plus 2,1 g Na_2CO_3 (1 Mol = 105,99 g). Diese Substanzen wurden in einem Verhältnis von 8 : 17 in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

3.3.3.2 Vorbereitung der Platten

Für die Beschichtung der Platten wurden sechs Petrischalen (100 x 12 mm) mit je 10 ml des Kopplungspuffers gefüllt. Drei Petrischalen wurden für die Separation proximaler Tubuluszellen verwendet und drei für die Separation distaler Tubuluszellen. Zu den 10 ml Kopplungspuffer wurden für die proximalen Tubuluszellen 100 μl des MAK 138H11 und für die distalen Tubuluszellen 100 μl des MAK 5A2 dazu pipettiert. Anschließend wurden die Platten bei 4°C für 24 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde die überstehende Antikörperlösung vorsichtig abpipettiert. Dann wurde auf alle Platten je 10 ml M 199 pipettiert, vorsichtig geschwenkt, und wieder abpipettiert.

3.3.3.3 Methode

Auf die so vorbereiteten Platten wurde nun das in 10 ml M199 suspendierte Pellet aufpipettiert. Die Platten wurden danach vorsichtig geschwenkt und bei 37°C im Brutschrank für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abpipettiert und auf die zweite Petrischale pipettiert. Diese wurde wieder für 30 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Für diese Zeit wurde in die erste Petrischale 5 ml M199 pipettiert. Dieser Vorgang wiederholte sich bei der dritten Platte. Auf diese Weise wurden die drei Platten für die proximalen Tubuluszellen und die drei Platten für die distalen Tubuluszellen behandelt. Anschließend wurden von allen sechs Platten mit einem Zellschaber die anhaftenden Zellen vorsichtig abgeschabt und in angesetztem Medium DMEM resuspendiert.

3.3.4 Methode B (Dynabeads)

Dynabeads sind eine Methode zur indirekten immunomagnetischen Zellseparation. Dabei handelt es sich um magnetische Polystyren-Kügelchen, welche mit einem Ratte anti-Maus Antikörper behaftet sind. Die in unserem Labor hergestellten Antikörper 138H11 und 5A2 waren monoklonale Maus Antikörper. Wir hatten für den MAK 138H11, welcher ein IgG₁ Antikörper ist den Dynabead Ratte anti-Maus Antikörper IgG₁. Für den MAK 5A2 welcher ein IgG_{2b} Antikörper ist, den Dynabead Ratte anti-Maus Antikörper IgG_{2b}. Die Dynabead-Antikörper befanden sich in einer Lösung bestehend aus 0,1 M Natriumphosphatpuffer (NaPO₄) pH 7,4 mit 0,1% humanem Serumalbumin und 0,02% Natriumazid (NaN₃). Die Lösung enthielt ca. 4×10^8 Kügelchen/ml. Der Durchmesser eines Kügelchens betrug 4,5 µm.

3.3.4.1 Waschen der Dynabeads

Da die Dynabeads in einer Lösung vorlagen welche 0,02% Natriumazid enthielt, mußten sie zweimal mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen werden. Dazu wurde der Phosphatpuffer (PBS) mit 0,1% Serumalbumin angereichert. Der so angereicherte Phosphatpuffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Vor Gebrauch wurde der Phosphatpuffer durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm steril filtriert. Zunächst wurden die Dynabeads in der Ampulle durch vorsichtiges Mischen resuspendiert. Dann wurde aus der Ampulle die benötigte Menge (150 µl) entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen (15ml) pipettiert. Dazu wurde dann 5 ml des angereicherten Phosphatpuffers pipettiert. Anschließend wurde das Röhrchen für eine Minute in den Dynal Magnetic Particle Concentrator (MPC 1) gestellt. Danach wurde die Pufferlösung vorsichtig abpipettiert und verworfen ohne die haftenden Dynabeads zu zerstören. Das Zentrifugenröhrchen stand dazu noch im MPC 1. Danach wurde das Röhrchen aus dem MPC 1 genommen und der Waschvorgang wurde wiederholt. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden die Dynabeads in 5 ml Pufferlösung suspendiert.

3.3.4.2 Methode

Für diese Methode wurden die Zellen zuerst mit der enzymatischen Verdauung, dann mit der Primärantikörper-Inkubation und dann mit der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation behandelt. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Medium M199 resuspendiert. Vor Gebrauch der Dynabeads wurde das Röhrchen erneut in den MPC 1 gestellt, eine Minute gewartet, und die Pufferlösung abpipettiert. Dann wurde das Röhrchen aus dem MPC 1 genommen. Zu den Dynabeads Ratte anti-Maus IgG₁ wurden nun die in 5 ml Medium M199 resuspendierten Zellen, welche mit dem Primärantikörper 138H11 inkubiert waren, pipettiert. Zu den Dynabeads Ratte anti-Maus IgG_{2b} wurden nun die in 5 ml Medium M199 resuspendierten Zellen, welche mit dem monoklonalen Primärantikörper 5A2 inkubiert waren, pipettiert.

Anschließend wurden die Röhrchen bei 4°C für 30 Minuten bei langsamer Rotation in einem Sample Mixer inkubiert.

Dann wurden die Röhrchen für eine Minute in den MPC 1 gestellt. Es wurden nun die Zellen, die sich mit dem Sekundärantikörper der Dynabeads gebunden hatten an die Seite des Magneten gezogen. Die in der Lösung noch vorhandenen nicht gebundenen Zellen wurden noch während das Röhrchen im MPC 1 stand vorsichtig abpipettiert. Nun wurden die separierten Zellen zweimal gewaschen. Die Röhrchen wurden dazu aus dem MPC 1 genommen. Es wurde nun zu jedem Röhrchen 5 ml Medium M199 pipettiert und vorsichtig gemischt. Dann wurden die Röhrchen wieder in den MPC 1 gestellt, eine Minute gewartet und die nicht bindenden in der Lösung vorhandenen Zellen vorsichtig abpipettiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Die gewaschenen, mit Dynabeads gebundenen Zellen wurden nun in 1 ml Medium M199 resuspendiert.

3.3.4.3 Ablösung der Dynabeads

Um die Dynabeads wieder von den Zellen zu lösen und damit die Zelloberflächen freizugeben wurden die Zellen mit einer Glycinlösung inkubiert.

Für die Glycinlösung wurden 3,75 g Glycin in 200 ml H₂O gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit Chlorwasserstoff am pH-Meter auf einen pH-Wert von 2,7 eingestellt und schließlich mit 500ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Zu den, in 1ml Medium M199 resuspendierten Zellen, wurde nun 5 ml der Glycinlösung pipettiert. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 1-5 Minuten bei langsamer Rotation inkubiert.

Anschließend wurden die Röhrchen für eine Minute in den MPC 1 gestellt. Hier wurden die abgelösten Dynabeads zur Seite des Magneten gezogen, und die in der Lösung befindlichen Zellen wurden vorsichtig abpipettiert. Die Röhrchen wurden nun mit PBS aufgefüllt, gemischt und acht Minuten bei 800 U und 10°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und dieser Waschvorgang noch zweimal wiederholt.

3.3.5 Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)

Auch bei den MACS-Microbeads handelt es sich um eine indirekte immunomagnetische Separation. Jedoch sind die magnetisch markierten Sekundärantikörper nicht größer als ca. 50 nm. Aufgrund dieser geringen Größe werden die Zellen in ihrer biologischen Funktion nicht beeinträchtigt und die Oberflächen der Zellen werden nicht blockiert. Auch das Ablösen der Microbeads konnte damit entfallen.

Für die proximalen Tubuluszellen, welche mit dem Primärantikörper 138H11 inkubiert wurden, wurde der magnetisch markierte Sekundärantikörper Ratte anti-Maus IgG₁ benutzt.

Für die distalen Tubuluszellen, welche mit dem Primärantikörper 5A2 inkubiert wurden, wurde der magnetisch markierte Sekundärantikörper Ratte anti-Maus IgG_{2a+b} benutzt.

3.3.5.1 Herstellung des MACS-Puffers

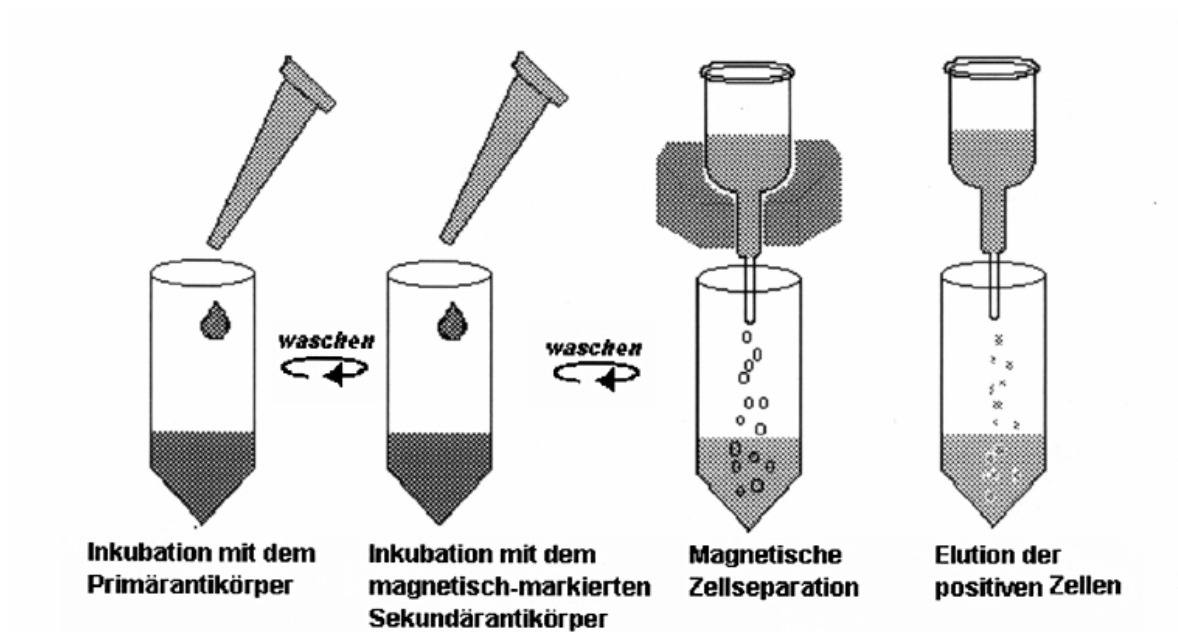
Für die Beschickung der Trennsäulen und Resuspendierung der Zellen wurde ein Puffer angesetzt. Der Puffer enthielt PBS mit 5 mM Ethylenditetraaminoessigsäure (EDTA) und 0,5% fetales Kälberserum (FCS). Dazu wurde 100 ml PBS mit 7,446 mg EDTA gemischt. Anschließend wurde dieser Puffer durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm steril filtriert. Danach wurde zu dem MACS-Puffer noch 500 µl FCS pipettiert. Das FCS wurde jedoch immer erst kurz vor Gebrauch des MACS-Puffers zugesetzt.

3.3.5.2 Methode

Für diese Methode wurden die Zellen zuerst mit der enzymatischen Verdauung, dann mit der Primärantikörper-Inkubation und dann mit der Percoll Dichtegradientenzentrifugation behandelt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden die Röhrchen für acht Minuten und 1000 U/min bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet in jedem Röhrchen mit 200 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Zu den mit dem Primärantikörper 138H11 inkubierten Zellen wurden nun 50 µl des magnetisch markierten Sekundärantikörpers IgG₁ pipettiert. Zu den mit dem Primärantikörper 5A2 inkubierten Zellen wurden nun 50 µl des magnetisch markierten Sekundärantikörpers IgG_{2a+b} pipettiert.

Dann wurden die Zellen bei 6-12°C für 15 Minuten inkubiert. Mischen der Zellen oder Rotation der Zellösung war nicht erforderlich. Anschließend wurden die Röhrchen für acht Minuten und 1000 U/min bei 10°C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen noch einmal mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Auf die Trennsäule im MiniMACS Magneten wurde nun 1 ml des MACS-Puffers aufgetragen. Dies diente der Befeuchtung der Trennsäule. Dieser Durchlauf wurde verworfen. Dann wurde die Zellsuspension auf die Trennsäule pipettiert. Anschließend wurde dreimal mit 500 µl MACS-Puffer die Trennsäule gespült. Diese Spülungen wurden verworfen. Dann wurde die Trennsäule aus dem MiniMACS Magneten genommen. Auf die Trennsäule wurde nun 1 ml des MACS-Puffers pipettiert und mit einem Stempel wurden die separierten Zellen aus der Säule gedrückt. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert und in 1 ml angesetztem DMEM Medium resuspendiert.

**Abb. 3:**

Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der indirekten immunomagnetischen Separation tubulärer Epithelien der menschlichen Niere (siehe 3.3.5.2).

3.4 Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurde die Zellsuspension zentrifugiert und mit 1 ml Medium M199 resuspendiert. Davon wurden 20 µl entnommen und mit 80 µl Typan-Blau (Mischungsverhältnis 1:5) gemischt und eine Minute inkubiert.

Anschließend wurde diese Lösung in die Neubauer Zählkammer überführt. Da sich bei mikroskopischer Betrachtung tote Zellen als blau gefärbt und vitale Zellen als nicht gefärbt darstellen, konnten sie leicht unterschieden werden. Bei einer 100fachen Vergrößerung wurden die vitalen und die toten Zellen gezählt. Wegen des Mischungsverhältnisses wurden die gezählten Zellen mit fünf multipliziert. Um die Zellzahl pro Milliliter zu berechnen, wurde der Wert mit 10^4 multipliziert. Da das Nierengewebe vor der Isolation gewogen wurde, war es möglich die Zellausbeute pro Gramm Nierengewebe zu ermitteln.

3.5 Zellkultivierung

3.5.1 Kulturmedium und Zusätze

Zusammensetzung des Kulturmediums zur Kultivierung proximaler und distaler Tubuluszellen:

Es wurden 500 ml Dulbecco`s modified Eagle`s Medium/Ham`s F 12 nutritional supplement (DMEM/HF 12) benötigt. Dazu wurden 5 ml in DMEM Medium gelöstes L-Glutamin (200 mmol/5 ml) zugesetzt. Das so angesetzte Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und bis maximal drei Wochen nach Zubereitung verwendet. Erst kurz vor Gebrauch des DMEM Mediums wurde 50 ml fetales Kälberserum (FCS) und 5 ml Hybridoma Fusion and Cloning Supplement (HFCS) zugegeben. Das fetale Kälberserum wurde 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

Nach der Separation proximaler und distaler Tubuluszellen wurden die in 1ml DMEM Medium gelösten Zellsuspensionen sofort in mittlere Kulturflaschen (260ml) überführt. Dazu wurden 49 ml des angesetzten DMEM Mediums pipettiert. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% CO₂ Spannung kultiviert. Diese Primärkulturen wurden ohne weitere Behandlung für 24 Stunden im Brutschrank belassen.

3.5.2 Mediumwechsel

Bei den Primärkulturen wurde frühestens nach 3-5 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels bei allen anderen Kulturen wurde vom mikroskopischen Aussehen der Zellen und Umschlagen des Indikators von rot nach gelb (Phenolphthalein) bei Anfall saurer Stoffwechselendprodukte abhängig gemacht.

Für den Mediumwechsel wurden die Zellkulturflaschen leicht geschwenkt um Zellfragmente und tote Zellen zu lösen. Dann wurde das Medium abgegossen und verworfen. Das abgegossene Medium wurde dann durch frisches angesetztes Medium DMEM ersetzt. Um eine Schädigung der Zellen durch zu kaltes Medium zu verhindern, wurde das Medium vor dem Aufpipettieren auf mindestens 20°C erwärmt. Mußte das Medium gewechselt werden bevor die Zellen am Boden der Kulturflasche einen haftenden Monolayer bildeten, so wurde das verbrauchte Medium abpipettiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Sodann erfolgte Zentrifugation für acht Minuten bei 1000U/min und 10°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und wieder in die Kulturflasche pipettiert.

3.5.3 Zellablösung

Um den homogenen Monolayer vom Boden der Kulturflaschen zu lösen und die Zellen damit für weitere Analysen in einer Suspension zu erhalten wurden zwei Methoden verwendet.

3.5.3.1 Zellablösung mit PERF

Zunächst mußte die PERF-Lösung angesetzt werden. Dazu wurden zu einem Liter Aqua destillata folgende Substanzen zugegeben: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,115 g Na_2HPO_4 . Zusätzlich wurden 10 mmol EDTA zu der Lösung gegeben. Die Lösung wurde durch einen Filter der Porengröße 0,45µm steril filtriert, und bei einer Temperatur von 4°C gelagert und verwendet.

Für die Zellablösung wurden die Kulturflaschen leerpipettiert und mit 10 ml eiskalter PERF-Lösung gefüllt. Die Kulturflaschen wurden dann für 10-20 Minuten auf Eis gestellt. Zwischendurch wurde mit einer Pipette der Boden leicht gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension aus den Kulturflaschen abpipettiert und in

Zentrifugenröhrchen überführt. Dann erfolgte Zentrifugation für acht Minuten bei 1000U/min und 10°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet entsprechend der weiteren Verarbeitung resuspendiert.

3.5.3.2 Zellablösung mit Trypsin/EDTA

Für die Zellablösung mit Trypsin/EDTA wurde 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in Ca^{2+} und Mg^{2+} freiem PBS Puffer verwendet. Zur Zellablösung wurden die Kulturflaschen leerpipettiert und mit ca.20ml HBSS gewaschen. Dadurch wurden serumhaltige Rückstände des Mediums entfernt, durch welche sonst das Enzym Trypsin in seiner Aktivität gehemmt würde. Danach wurde die Trypsin/EDTA Lösung in die Kulturflaschen pipettiert. Es genügte ein die Oberfläche bedeckender Flüssigkeitsfilm. Anschließend wurden die Kulturflaschen für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Inhalt der Kulturflaschen in Zentrifugenröhrchen abgegossen, zentrifugiert (10 min., 1000U/min., 10°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde entsprechend der weiteren Verarbeitung resuspendiert.

3.6 Zellcharakterisierung

Zur Charakterisierung proximaler und distaler Tubuluszellen wurden die unterschiedliche Antigenstruktur der Zelloberflächen, die Produktion von Enzymen und die Elektronenmikroskopie verwendet.

3.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zunächst wurden die Zellen mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert. Dies war für proximale Tubuluszellen der MAK 138H11 und für distale Tubuluszellen der MAK 5A2. Es wurden zu 100 µl der Zellsuspension 10 µl des jeweiligen Primärantikörpers gegeben, und vorsichtig gemischt. Dann folgte Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen dreimal mit physiologischer NaCl gewaschen, und nach der letzten Zentrifugation (10 min., 1000 U/min., 10°C) mit 100 µl physiologischer NaCl resuspendiert.

Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-markierter polyklonaler Ziege anti-Maus IgG und IgM (Fc und Fab) verwendet. Dieser Sekundärantikörper fluoreszierte bei

Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop rot. Zu 100 µl der Zellsuspension wurden nun 5 µl des Cy3 markierten Sekundäntikörpers pipettiert. Anschließend erfolgte Inkubation für 45 Minuten in Dunkelheit, bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen dreimal mit physiologischer NaCl gewaschen, und nach der letzten Zentrifugation (10 min., 1000U/min., 10°C) mit 100 µl physiologischer NaCl resuspendiert. Davon wurden 5 µl auf einen Objektträger pipettiert. Dann wurde darauf ein Deckgläschen gelegt, und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Dunkelheit betrachtet.

3.6.2 Enzymbestimmungen im Überstand

Nach Zentrifugation des Zellkulturmediums wurden aus dem Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten mehrere Enzyme bestimmt. Es wurden folgende Enzyme bestimmt: Alkalische Phosphatase (AP), Aminopeptidase M (APM), Dipeptidylpeptidase IV (DAP IV), Gamma-Glutamyl-Transferase (γGT).

- **Alkalische Phosphatase**

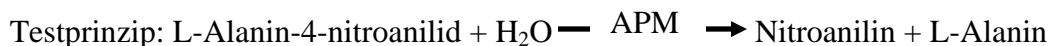
Testprinzip:



In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurde 3 ml Reagenzlösung und 50 µl Probe pipettiert. Bei 25°C wurde die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von Hg 405 nm gegen Luft gemessen. Die Extinktion wurde bei einer Gesamtdauer der Messung von 10 Minuten jede Minute abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert gebildet und in die Berechnung eingesetzt.

Berechnung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase : $U/l = 3300 \cdot \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}$.

- **Aminopeptidase M**



In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurde 1,6 ml 0,05m Trispuffer pH 8 und 0,2 ml APM Substrat und 0,2 ml Probe pipettiert. Bei 37°C wurde die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von Hg 405 nm gegen Luft gemessen.

Die Extinktion wurde bei einer Gesamtdauer der Messung von 10 Minuten jede

Minute abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert gebildet und in die Berechnung eingesetzt.

$$\text{Berechnung der Aktivität der Aminopeptidase M : mU/ml} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000 \cdot 60}{t(\text{sec.}) \cdot 9,62 \cdot d \cdot v}$$

Der molare Extinktionskoeffizient von Nitroanilin beträgt $9,62 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

- **Dipeptidylpeptidase IV**

Testprinzip :

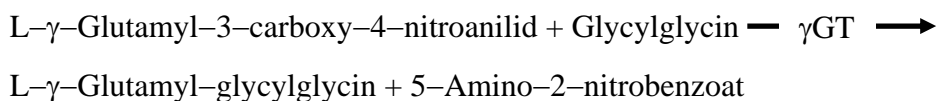


In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurde 1,6 ml 0,05m Trispuffer pH 8 und 0,2 ml DAP IV Substrat und 0,2 ml Probe pipettiert. Bei 37°C wurde die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von Hg 405 nm gegen Luft gemessen. Die Extinktion wurde bei einer Gesamtdauer der Messung von 10 Minuten jede Minute abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert gebildet und in die Berechnung eingesetzt.

$$\text{Berechnung der Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV: mU/ml} = 104 \cdot \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min.}$$

- **Gamma-Glutamyl-Transferase**

Testprinzip :



In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke wurde 2 ml Reagenzlösung und 200 µl Probe pipettiert. Bei 25°C wurde die Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von Hg 405 nm gegen Luft gemessen. Die Extinktion wurde bei einer Gesamtdauer der Messung von 10 Minuten jede Minute abgelesen. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert gebildet und in die Berechnung eingesetzt.

Berechnung der Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase:

$$\text{U/l} = 1158 \cdot \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}$$

3.6.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Charakterisierung proximaler und distaler Tubuluszellen wurden die Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Medium von den Platten abgekippt, und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 Minuten stehengelassen. Die jetzt leicht angetrockneten Zellen konnten nun mit den Enzymfärbungen (siehe 3.6.2) direkt auf der 96-Well-Patte angefärbt werden. Die so gefärbten Zellen wurden mit dem Inversionsmikroskop betrachtet und mit der aufgesetzten Kamera fotografiert. Außerdem wurden die 96-Well-Platten nach der Färbung noch durch einen Elisareader geschickt und bei Hg 405 nm die Extinktionen gemessen.

3.6.4 Einbettung und Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen wurden diese in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden fixiert in 4 % Paraformaldehyd + 0,4 % Glutaraldehyd/PBS (pH 7) und Na-Cakodylatpuffer und 1 % Osmiumtetroxyd (OsO_4). Nach der Osmiumfixierung wurden die Zellen aus den Kulturschalen herausgekratzt und in Agar eingeschlossen. Anschließend wurden die Zellen mit Alkohol entwässert. Dann erfolgte Infiltration mit Spurr's Medium. Dann wurden die Zellen polymerisiert. Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen und Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 300 von Philipps durchgeführt.

4.1	Nierengewebe	Seite	31
4.2	Isolationsmethoden	Seite	31
4.2.1	Enzymatische Andauung	Seite	31
4.2.1.1	Anzahl lebender Zellen pro Nierengewebe bei unterschiedlicher enzymatischer Andauung	Seite	32
4.3	Separationsmethoden	Seite	33
4.3.1	Inkubation mit dem Primärantikörper	Seite	33
4.3.2	Percoll Dichtegradient	Seite	33
4.3.3	Methode A (Antikörper-Platten)	Seite	35
4.3.4	Methode B Dynabeads)	Seite	36
4.3.5	Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)	Seite	36
4.4	Zellkultivierung	Seite	36
4.5	Zellcharakterisierung	Seite	42
4.5.1	Indirekte Immunfluoreszenz	Seite	42
4.5.2	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	42
4.5.2.1	Enzymbestimmungen im Überstand	Seite	43
4.5.3	Immunhistochemie	Seite	44
4.5.3.1	Immunhistochemische Bestimmung proximaler und distaler Tubuluszellen nach elf Tagen Kultivierung auf einer 96-Well-Platte. Extinktionsmessung bei unterschiedlicher Zellzahl nach Enzymfärbung.	Seite	45
4.5.4	Einbettung und Elektronenmikroskopie	Seite	50

4 Ergebnisse

4.1 Nierengewebe

Zwischen Mai 1994 und Juli 1995 wurden von 30 durchgeführten Tumornephrektomien Gewebe entnommen, isoliert und kultiviert. Dabei stammten 70% der Gewebe von männlichen Patienten und 30% von weiblichen Patienten, was ungefähr der für das Nierenzellkarzinom bekannten Geschlechtsverteilung von 1,5-2:1 entsprach. Das Alter der Patienten lag zwischen 45 und 80 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 65,4 Jahren. Das entnommene Gewebe wurde immer sofort weiterverarbeitet.

4.2 Isolationsmethoden

4.2.1 Enzymatische Andauung

Bei der enzymatischen Andauung zeigten sich die eingesetzten Enzyme beim direkten Vergleich innerhalb eines Versuches als unterschiedlich effektiv. Hierbei wurde direkt nach der enzymatischen Andauung eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer angeschlossen. Da nach diesem Isolationsschritt die Zellen in ihrer Gesamtheit (Nierenzellen, Fibroblasten Blutzellen etc.) vorlagen, konnten lediglich Erythrozyten durch ihren fehlenden Zellkern ausgeschlossen werden. Als ungünstig stellte sich die Verwendung von hohen Trypsin-Konzentrationen heraus. Es wurden zwar viele Zellen damit isoliert, jedoch betrug die Anzahl der toten Zellen nahezu 40%. Außerdem wurde, bei den mit Trypsin isolierten Zellen, bei der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene, ein deutlich geringeres Signal Fluoreszenz festgestellt. Offensichtlich schädigt Trypsin die Membranproteine der Zelloberfläche. Wichtig war außerdem, dass die Zellen, nach einer Zentrifugation sich möglichst gut homogenisieren ließen und nicht verklumpten. Die besten Ergebnisse, d.h. hohe Zellausbeute, wenig tote Zellen, intakte Oberflächenantigene, kein Verklumpen der Zellen, wurde mit der Enzymkombination Nummer 12 in der Tabelle erreicht.

In der nachfolgenden Tabelle wird die Anzahl lebender Zellen pro Gramm Nierengewebe bei unterschiedlichen enzymatischen Andauungen dargestellt.

4.2.1.1 Anzahl lebender Zellen pro Gramm Nierengewebe bei unterschiedlicher enzymatischer Andauung

Enzymkombination	Inkubationszeit	Zellzahl/Gramm
Trypsin 0,1% Collagenase/Dispase 0,1% + DNase I 0,01% + Hyaluronidase 0,1%	1h	3 310 104
Trypsin 0,1% Collagenase IV 0,1% + DNase I 0,01% + Hyaluronidase 0,1%	1h	2 897 350
Trypsin 0,2% Collagenase IV 0,2% + DNase I 0,02% + Hyaluronidase 0,2%	1h	2 030 000
Trypsin 0,5% Collagenase IV 0,15% + DNase I 0,15% + Hyaluronidase 0,15%	1h	8 992 537
Trypsin 0,5% Collagenase/Dispase 0,2% + DNase I 0,02% + Hyaluronidase 0,2%	1h	3 796 296
Trypsin 0,5% Collagenase IV 0,2% + DNase I 0,02% + Hyaluronidase 0,2%	1h	3 593 750
Trypsin 0,5% Collagenase/ Dispase 0,2% + DNase I 0,05% + Hyaluronidase 0,2%	1h	4 820 000
Collagenase IV 0,1% Collagenase IV 0,1%	1h 1h	3 500 000
Collagenase/ Dispase 0,1% + DNase I 0,01% Collagenase/ Dispase 0,1% + DNase I 0,01%	1h 1h	6 656 626
Collagenase IV 0,1% + DNase I 0,01% Collagenase IV 0,1% + DNase I 0,01%	1h 1h	5 097 087
Collagenase/Diapase 0,1% + DNase I 0,01% Hyaluronidase 0,1%	1h 1h	5 224 359
Collagenase IV 0,1% + DNase I 0,01% Hyaluronidase 0,1%	1h 1h	5 258 947

4.3 Separationsmethoden

4.3.1 Inkubation mit dem Primärantikörper

Direkt nach der enzymatischen Andauung wurde eine Primärantikörperinkubation und nachfolgend eine Sekundärantikörperinkubation mit Cy3 (gegen IgG und IgM gerichtet) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop und in einfachem Durchlicht angesehen. Da hier die Zellen noch in ihrer Gesamtheit vorlagen, war es möglich durch Vergleich einer Stelle in Durchlicht und Fluoreszenz die markierten Zellen als proximale und distale Tubuluszellen zu erkennen und von den anderen Zellen zu unterscheiden. Außerdem konnte man durch den Vergleich von Erythrozyten zu markierten Tubuluszellen auf deren Größe schließen. Die durchschnittliche Größe von proximalen und distalen Tubuluszellen betrug $15\mu\text{m}$.

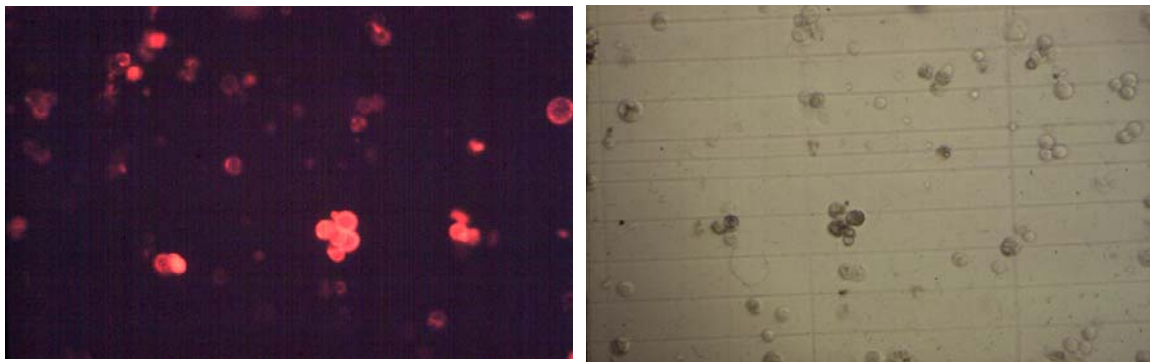


Abb. 4: Proximale Tubuluszellen im Größenvergleich zum Erythrozyt

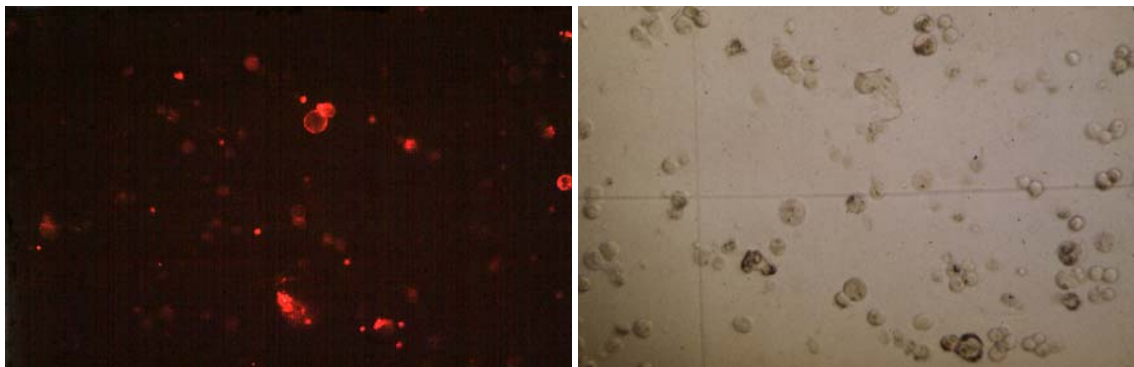


Abb. 5: Distale Tubuluszellen im Größenvergleich zum Erythrozyt

4.3.2 Percoll Dichtegradient

Durch die Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen in einem weiteren Schritt separiert. Die Zellen wurden gemäß ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt. Der Dichtebereich von proximalen und distalen Tubuluszellen liegt zwischen $1,045\text{g/ml}$ und

1,07g/ml (van der Biest et al. 1994). Das mitgeführte Teströhrchen mit den verschiedenen farbigen Markerbeads zeigte die Verteilung der verschiedenen Dichtebereiche über den gesamten Percoll Dichtegradienten. Im Vergleich zu dem, mit den Markerbeads mitgeführten Röhrchen, war es nun möglich den entsprechenden Dichtebereich abzupipettieren.

+

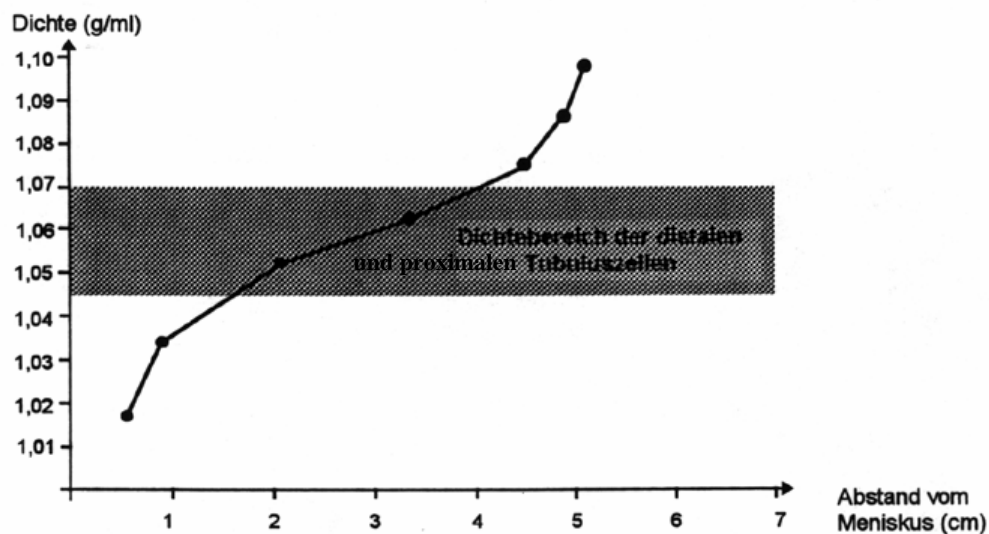
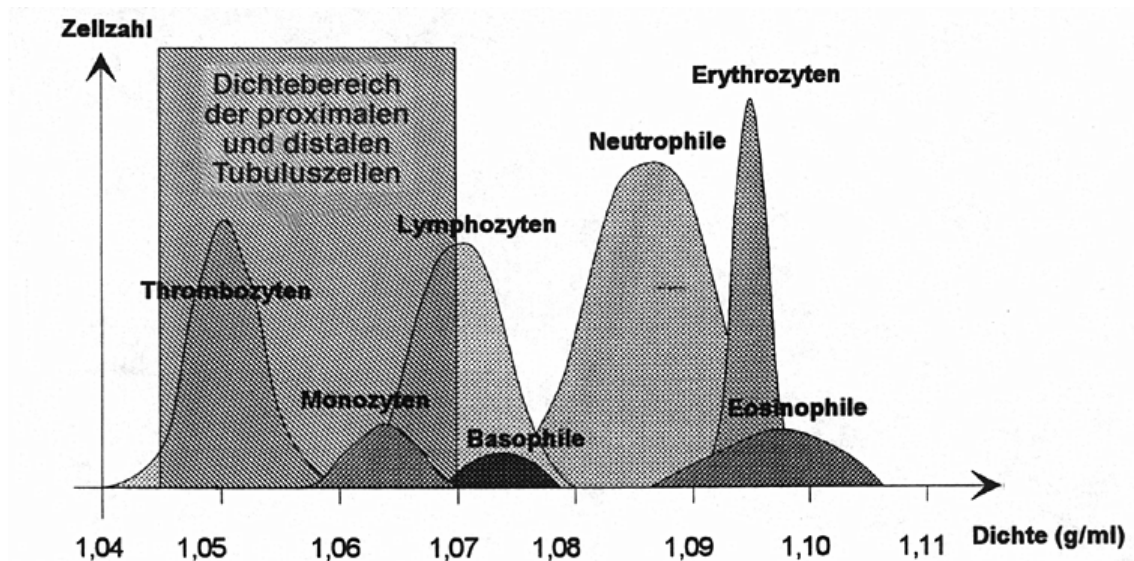


Abb. 6:

Eichkurve Verteilung der Dichtebereiche der distalen und proximalen Tubuluszellen über den Percoll Dichtegradienten

Die mit Hilfe der Neubauerkammer bestimmte Zellzahl vor der Dichtegradientenzentrifugation und nach der Dichtegradientenzentrifugation zeigte eine Zellzahlverminderung um ca. zwei Zehnerpotenzen. Dies erklärt sich unter anderem mit dem Verlust von Blutzellen, zB. Granulozyten (Dichtebereich 1,08-1,09g/ml), Erythrozyten (Dichtebereich 1,09-1,10), und einem Teil der Lymphozyten (Dichtebereich 1,06-1,08g/ml).

Wie die folgende Abbildung zeigt, befinden sich im Dichtebereich der proximalen und distalen Tubuluszellen auch noch weitere Blutzellen, Monozyten (Dichtebereich 1,05-1,07g/ml) und ein Teil der Lymphozyten (Dichtebereich 1,06-1,08g/ml).

**Abb. 7:**

Dichtebereiche der einzelnen Blutzellen im Vergleich zum Dichtebereich proximaler und distaler Tubuluszellen

4.3.3 Methode A (Antikörper-Platten)

Für die Beschickung der Antikörper-Platten wurde das Zellpellet direkt nach der enzymatischen Andauung und Percoll-Dichtegradientenzentrifugation, also ohne Primärantikörper-Inkubation, verwendet. Zu diesem Zeitpunkt bestand das Pellet noch aus vielen verschiedenen Zellen. Um eine Separierung proximaler und distaler Tubuluszellen zu erreichen wurden die Platten mit einer Antikörper-Suspension beschickt. An diese monoklonalen Antikörper, 138H11 für proximale und 5A2 für distale Tubuluszellen sollten die Zellen sich anheften. Es zeigte sich, daß nach Inkubation mit dem Antikörper und der Spülung mit M199, womit nicht haftende Zellen abgespült werden sollten, die Zelldichte mangelhaft war. Außerdem gelang es nicht proximale und distale Tubuluszellen in hoher Reinheit mit diesem Schritt zu separieren. Nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung der von den Platten abgelösten und resuspendierten Zellen zeigte im Vergleich zum Durchlicht, daß viele verschiedene Zellen vorhanden waren. Die Anzahl fluoreszenzmarkierter Zellen betrug lediglich 30-40%. Damit war es nicht möglich mit dieser Methode eine reine Zellkultur anzusetzen.

4.3.4 Methode B (Dynabeads)

Bei der indirekten immunomagnetischen Separation mit Dynabeads wurde das Zellpellet nach enzymatischer Andauung, Primärantikörperinkubation, Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durch einen Sekundärantikörper, welcher magnetisch markiert war (Dynabeads), aufgetrennt. Dabei zeigte sich bei der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung, daß die Dynabeads eine Eigenfluoreszenz hatten. Außerdem stellte sich die Größe der Dynabeads mit $4,5\mu\text{m}$ im Vergleich zur durchschnittlichen Größe der Tubuluszellen mit ca. $15\mu\text{m}$ als zu groß heraus. Dadurch war es nicht möglich die Zellen zu beurteilen. Die anschließende Ablösung der Dynabeads mittels einer Glycinlösung zeigte in der nachfolgenden Bestimmung von Zellzahl und Vitalität keinen Erfolg. Lediglich 5% der Zellen überlebten die Glycinablösung, 95% der Zellen starben ab.

4.3.5 Methode C (Magnetic Cell Sorting MACS)

Auch die Separation durch die Microbeads ist eine indirekte immunomagnetische Separation. Hier wurde das Zellpellet nach enzymatischer Andauung, Primärantikörperinkubation, Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durch einen Sekundärantikörper welcher magnetisch markiert war (Microbeads) aufgetrennt. Allerdings beträgt der Durchmesser der Microbeads lediglich ca. 50nm . Bei dieser Größe ist es nicht nötig die Microbeads wieder abzulösen. Sie beeinträchtigen die Oberflächenstruktur der Zellen nicht. Die anschließende Bestimmung der Zellzahl und Vitalität ergab im Durchschnitt 85% lebende Zellen und 15% tote Zellen. Bei der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich keine Eigenfluoreszenz der Microbeads. Im Vergleich Durchlicht zu Fluoreszenz waren fast alle Zellen (95%) markiert. Die so gewonnenen Zellpopulationen von reinen und lebenden proximalen und distalen Tubuluszellen konnten nun kultiviert werden.

4.4 Zellkultivierung

Im Anschluß an die Separierung durch die Microbeads wurde das Pellet in 1 ml DMEM Medium gelöst. Darin befanden sich durchschnittlich $1-2 \times 10^6$ Zellen /ml. Diese Zellsuspension wurde nun in mittlere Kulturflaschen pipettiert. Dazu wurde angesetztes DMEM Medium pipettiert. Für die nächsten 24 Stunden wurden die Zellen im

Brutschrank inkubiert. Nach ca. 2-3 Tagen fingen die Zellen an adhärent zu wachsen. Dabei wurden unter dem Inversionsmikroskop aber immer noch vereinzelt nicht haftende Zellen gesehen. Nach ca. 7-10 Tagen bildeten die Zellen einen homogenen Monolayer der fast den ganzen Boden der Kulturflasche bedeckte. Sowohl proximale als auch distale Tubuluszellen zeigten eine stärker werdende Granulierung, stellten das Zellwachstum ein und starben ab. Die mittlere Lebensdauer betrug dabei ca. 30 Tage. Zu Beginn der Zellkultivierung wurde HFCS zugesetzt. Die Zellkultur sowohl proximaler als auch distaler Tubuluszellen zeigte daraufhin ein überschießendes Wachstum, so daß darauf verzichtet wurde. Auch auf anfängliche Antibiotikagaben (Gentamycin) wurde verzichtet. Die Zellen zeigten bei Gentamycin-Gabe eine starke Vakuolenbildung im Zellplasma. Durch streng steriles Arbeiten gelang es die Zellkulturen für die gesamte Lebensdauer zu bearbeiten ohne eine Infektion mit Bakterien oder Pilzen zuzugewinnen. Damit wurde eine Antibiotikagabe überflüssig. Während der Lebensdauer einer Zellkultur wurden die adhärent wachsenden Zellen in regelmäßigen Abständen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und subkultiviert. Dabei zeigte sich die Zellablösung mit PERF-Lösung als nicht geeignet, da die Zellen sich nur schlecht vom Boden der Kulturflasche lösten. Die Behandlung mit der PERF-Lösung mußte wiederholt werden, damit alle Zellen sich vom Boden lösten. Die nachfolgende Bestimmung von Zellzahl und Vitalität ergab, daß viele Zellen (fast 70%) durch diese Behandlung abgestorben waren. Dagegen gelang die *Zellablösung mit Trypsin/EDTA* problemlos. Die Zellen lösten sich vom Boden der Kulturflasche und nahmen eine kugelige Form an. Dies war unter dem Inversionsmikroskop gut zu sehen. Anschließend konnten die Zellen subkultiviert werden oder für die Zellcharakterisierung weiter verarbeitet werden. Auch die nachfolgende Bestimmung von Zellzahl und Vitalität zeigte, daß fast alle Zellen, ca. 95% diese Ablösung überlebten.

Abbildungen proximaler Tubuluszellen während der Kultivierung

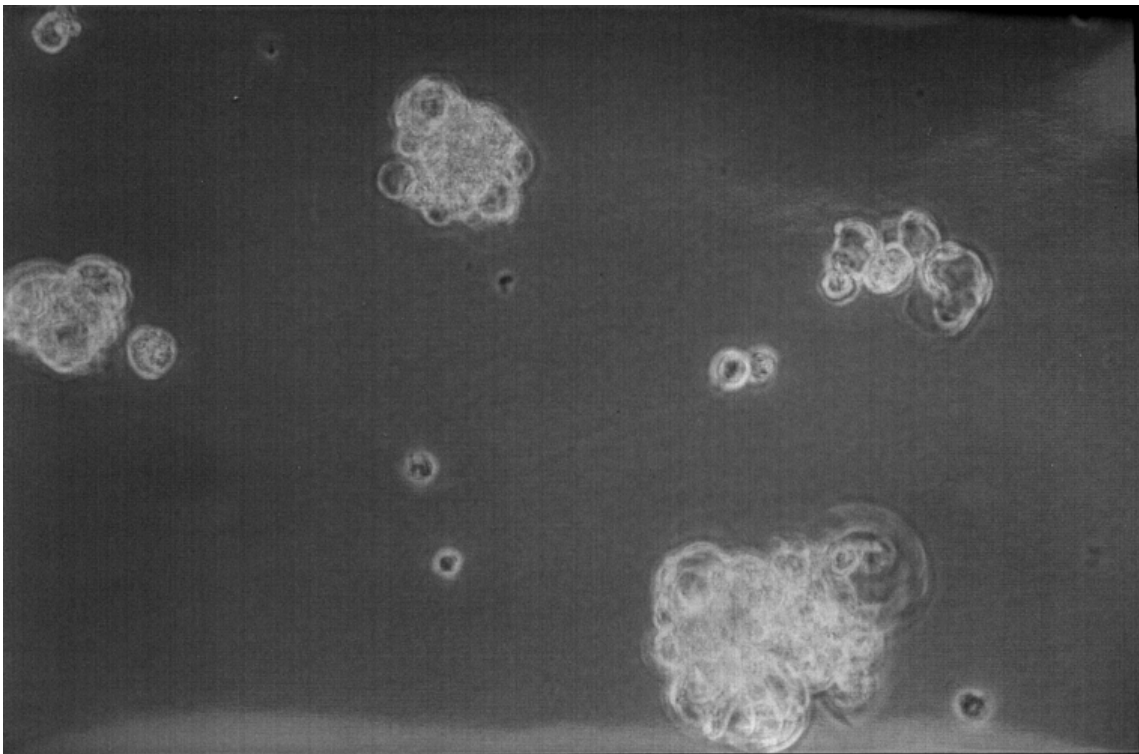


Abb. 8: Proximale Tubuluszellen unmittelbar nach der Separierung

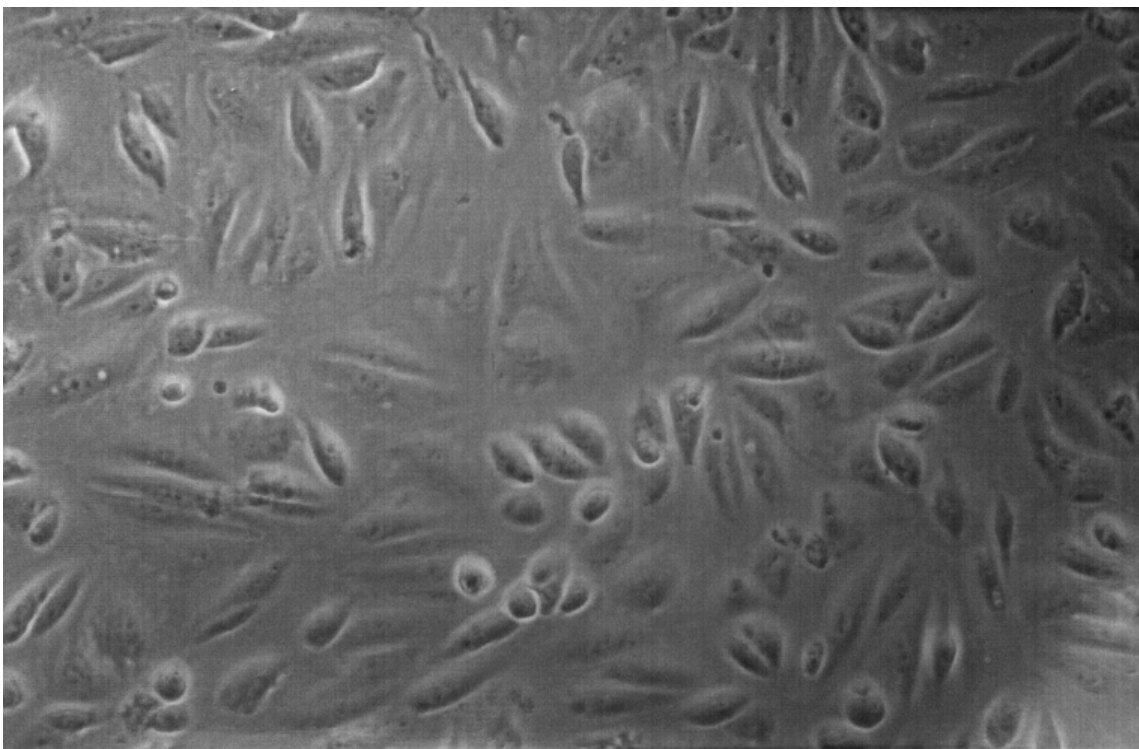


Abb. 9: Proximale Tubuluszellen am siebten Tag nach der Aussaat

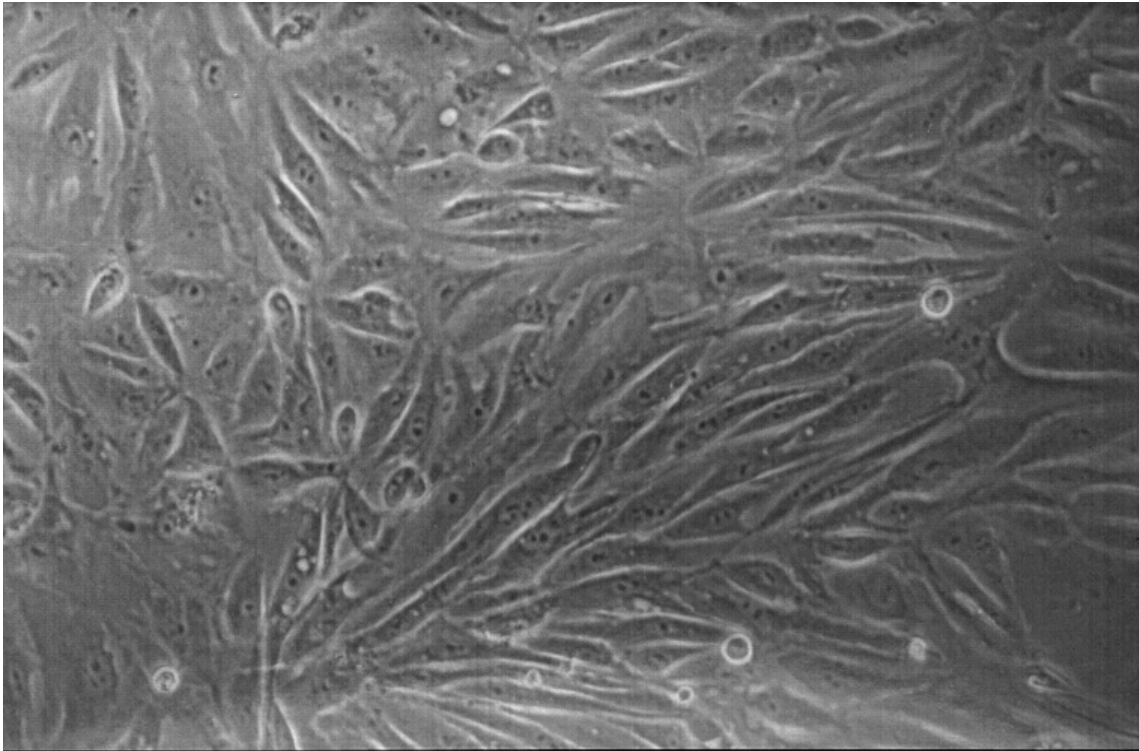


Abb. 10: Proximale Tubuluszellen am vierzehnten Tag nach der Aussaat

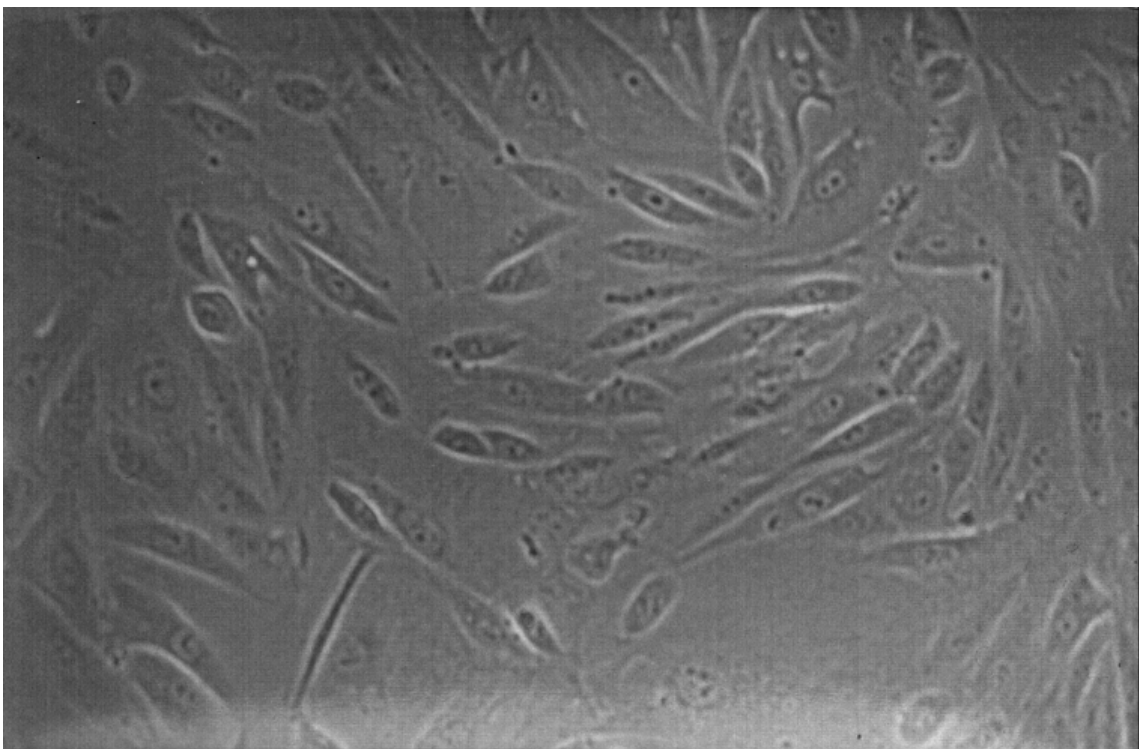


Abb. 11: Proximale Tubuluszellen am einundzwanzigsten Tag nach der Aussaat

Abbildungen distaler Tubuluszellen während der Kultivierung

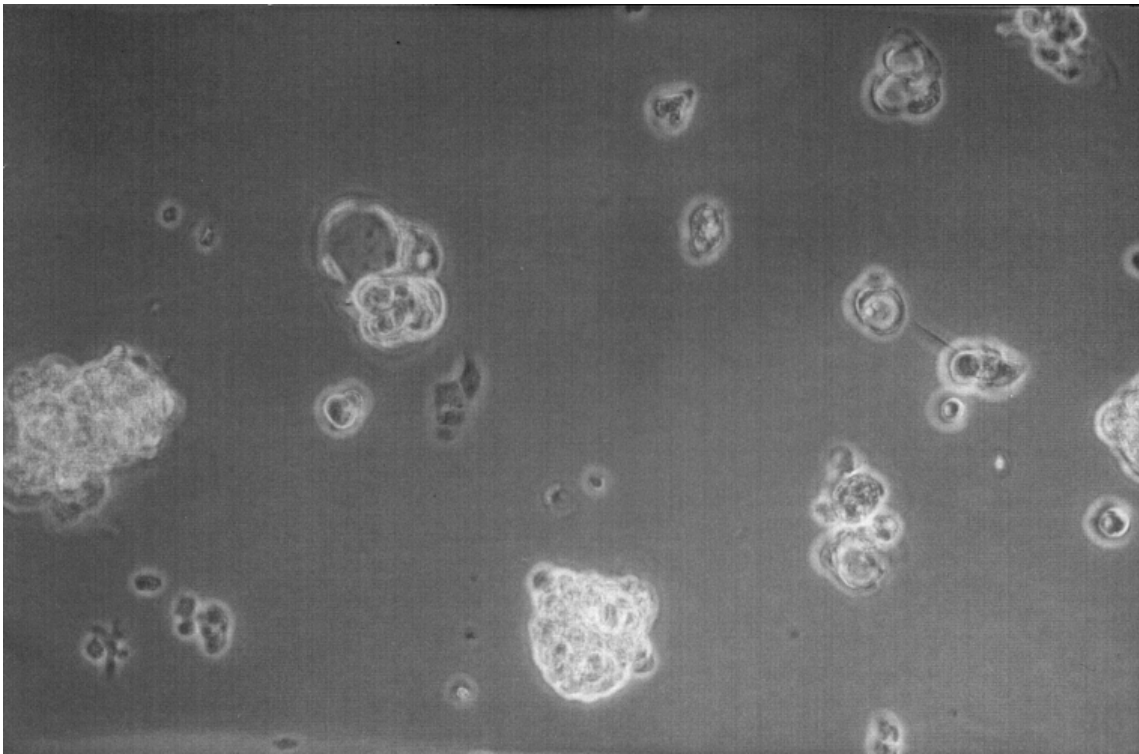


Abb. 12: Distale Tubuluszellen unmittelbar nach der Separierung

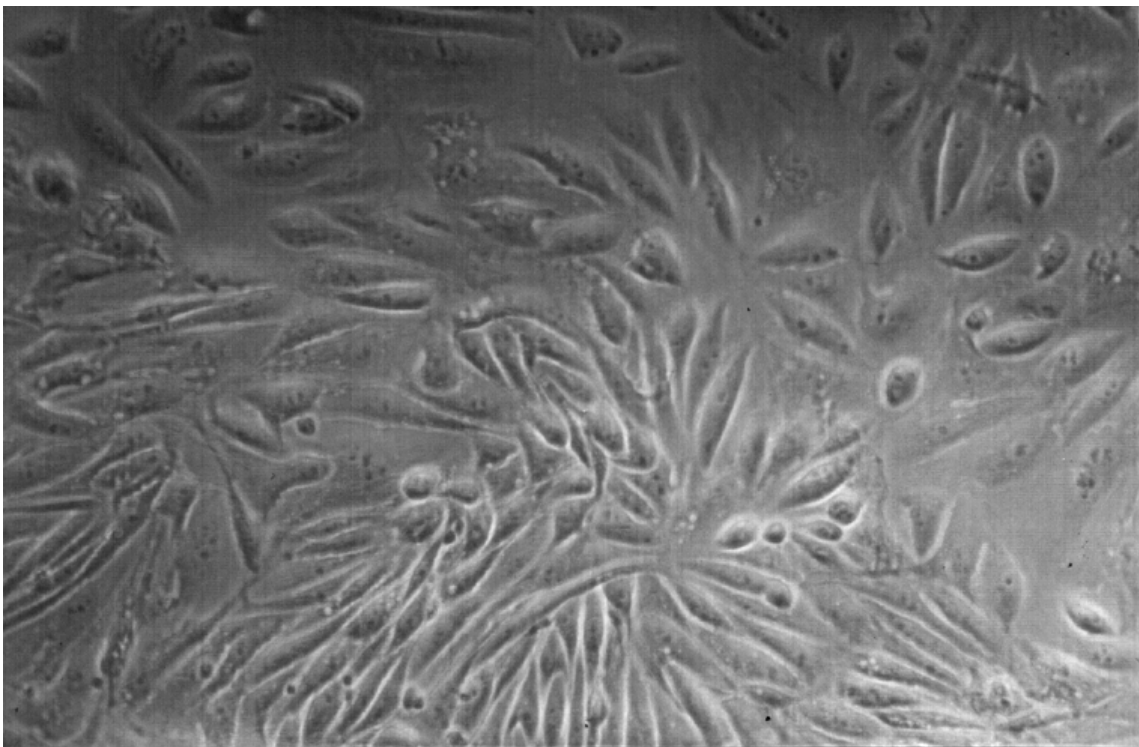


Abb. 13: Distale Tubuluszellen am siebten Tag nach der Aussaat

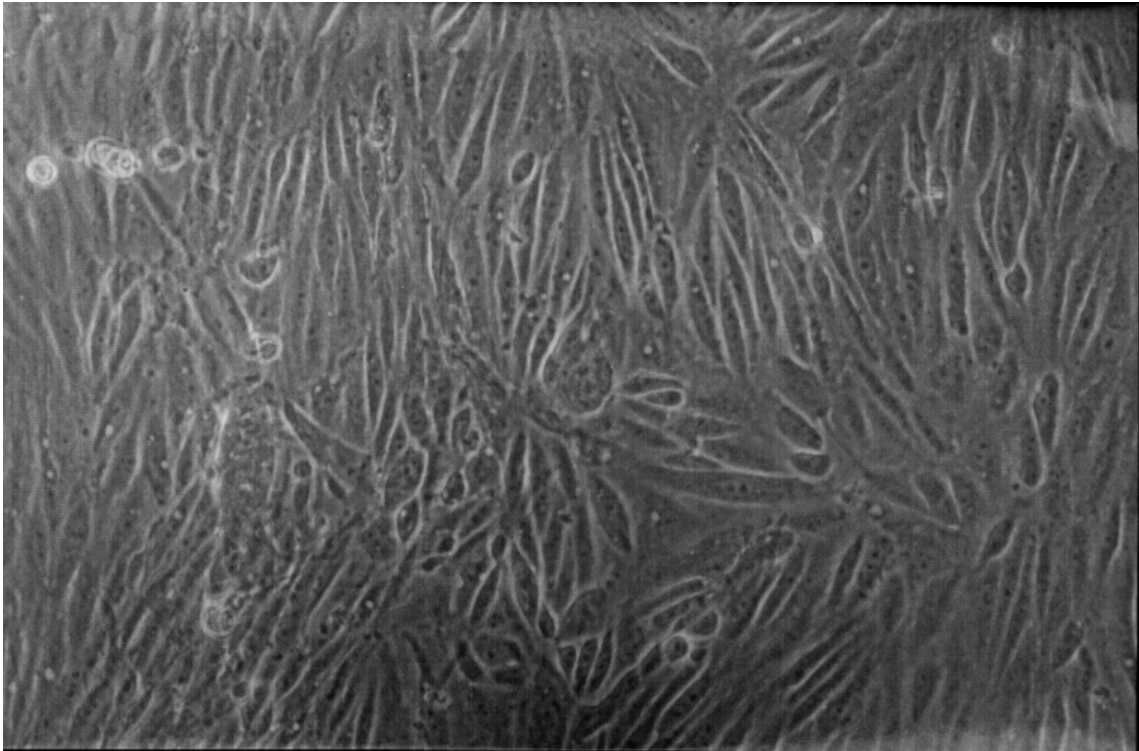


Abb. 14: Distale Tubuluszellen am vierzehnten Tag nach der Aussaat

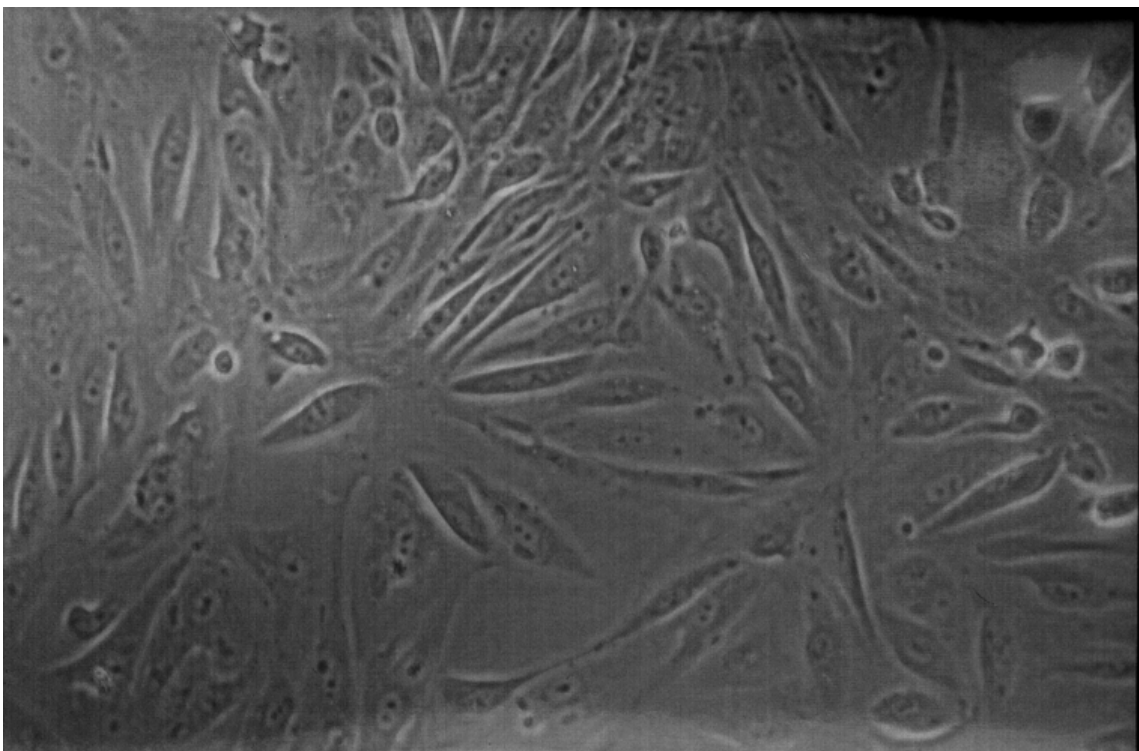


Abb. 15: Distale Tubuluszellen am einundzwanzigsten Tag nach der Aussaat

4.5 Zellcharakterisierung

4.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde einmal nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation und nach der Separierung mit den Microbeads durchgeführt. Dabei zeigte sich nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation im Vergleich Fluoreszenz zu Durchlicht eine Markierung von ca. 30% der Zellen. Nach der Separierung mit den Microbeads ergab sich im Vergleich Durchlicht zu Fluoreszenz eine Markierung von ca. 95% der Zellen.

4.5.2 Enzymbestimmungen im Überstand

Nach Zentrifugation des Zellkulturmediums einer mittleren Kulturflasche wurden aus dem Überstand die Aktivität der Enzyme Alkalische Phosphatase, Aminopeptidase M, Dipeptidylpeptidase IV, und Gamma-Glutamyl Transferase zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

4.5.2.1 Enzymbestimmungen im Überstand

Alkalische Phosphatase [mU/ml]

	Tubuluszellen	
	Proximale	Distale
4. Tag	46,9	44,5
7. Tag	49,5	42,9
9. Tag	40,3	44,5

Aminopeptidase M [mU/ml]

	Tubuluszellen	
	Proximale	Distale
4. Tag	1,5	0,6
7. Tag	0,2	0
9. Tag	0	0

Dipeptidylpeptidase IV [mU/ml]

	Tubuluszellen	
	Proximale	Distale
4. Tag	0,6	0,5
7. Tag	0,9	1,4
9. Tag	0,7	0,7

 γ Glutamyl-Transferase [mU/ml]

	Tubuluszellen	
	Proximale	Distale
4. Tag	4,9	1,8
7. Tag	2,1	2,4
9. Tag	2,5	3,9

4.5.3 Immunhistochemie

Am elften Tag der Kultivierung wurde eine immunhistochemische Charakterisierung proximaler und distaler Tubuluszellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf eine 96-Well-Platte übertragen. Die Zellen wurden direkt auf der 96-Well-Platte mit den Enzymfärbungen angefärbt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte bei 504 nm durch einen Elisareader geschickt und die Extinktion gemessen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Extinktion proximaler und distaler Tubuluszellen in abnehmender Zellzahl bei den unterschiedlichen Enzymfärbungen.

4.5.3.1 Immunhistochemische Bestimmung proximaler und distaler Tubuluszellen nach elf Tagen Kultivierung auf einer 96-Well-Platte. Extinktionsmessung bei unterschiedlicher Zellzahl nach Enzymfärbung.

Alkalische Phosphatase

	1.000 Zellen	500 Zellen	250 Zellen	125 Zellen	60 Zellen
Proximale Tubuluszellen	0,020	0,014	0,011	0,002	0
Distale Tubuluszellen	0,018	0,011	0,003	0	0

Aminopeptidase M

	1.000 Zellen	500 Zellen	250 Zellen	125 Zellen	60 Zellen
Proximale Tubuluszellen	0,039	0,023	0,022	0,011	0,014
Distale Tubuluszellen	0,034	0,028	0,024	0,012	0

Dipeptidylpeptidase IV

	1.000 Zellen	500 Zellen	250 Zellen	125 Zellen	60 Zellen
Proximale Tubuluszellen	0,033	0,052	0,011	0,003	0,001
Distale Tubuluszellen	0,030	0,025	0,021	0,009	0,001

γ Glutamyl-Transferase

	1.000 Zellen	500 Zellen	250 Zellen	125 Zellen	60 Zellen
Proximale Tubuluszellen	0,065	0,473	0,225	0,058	0,007
Distale Tubuluszellen	0,594	0,518	0,378	0,093	0,022

Außerdem wurden die auf der 96-Well-Platte gefärbten proximalen und distalen Tubuluszellen unter dem Inversionsmikroskop betrachtet und fotografiert.

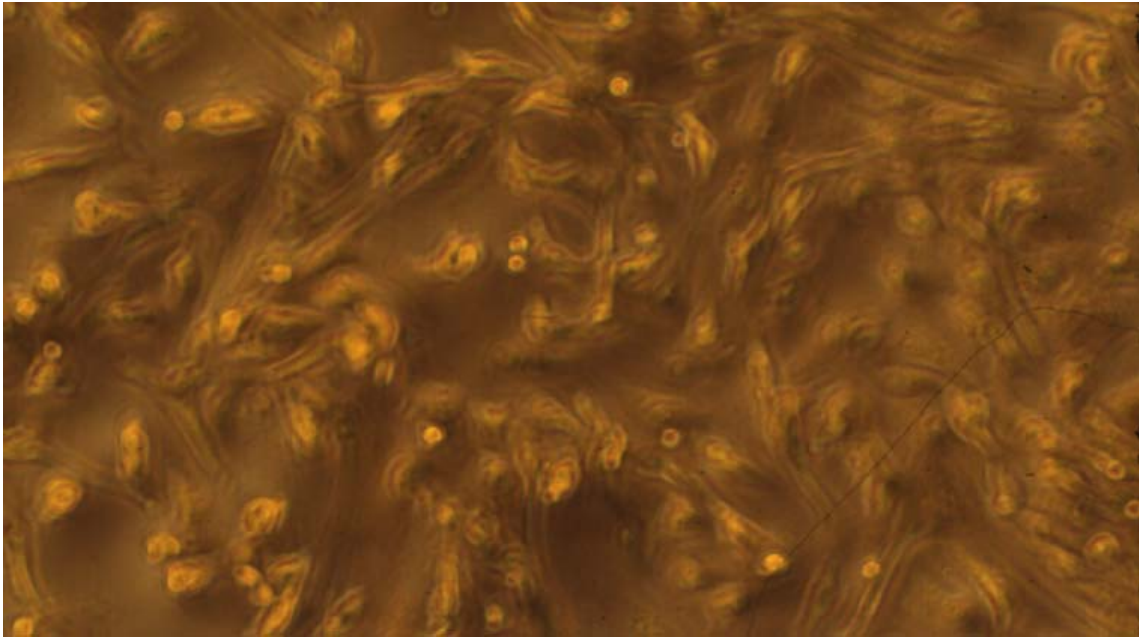


Abb. 16: Proximale Tubuluszelle bei Färbung auf Aminopeptidase M

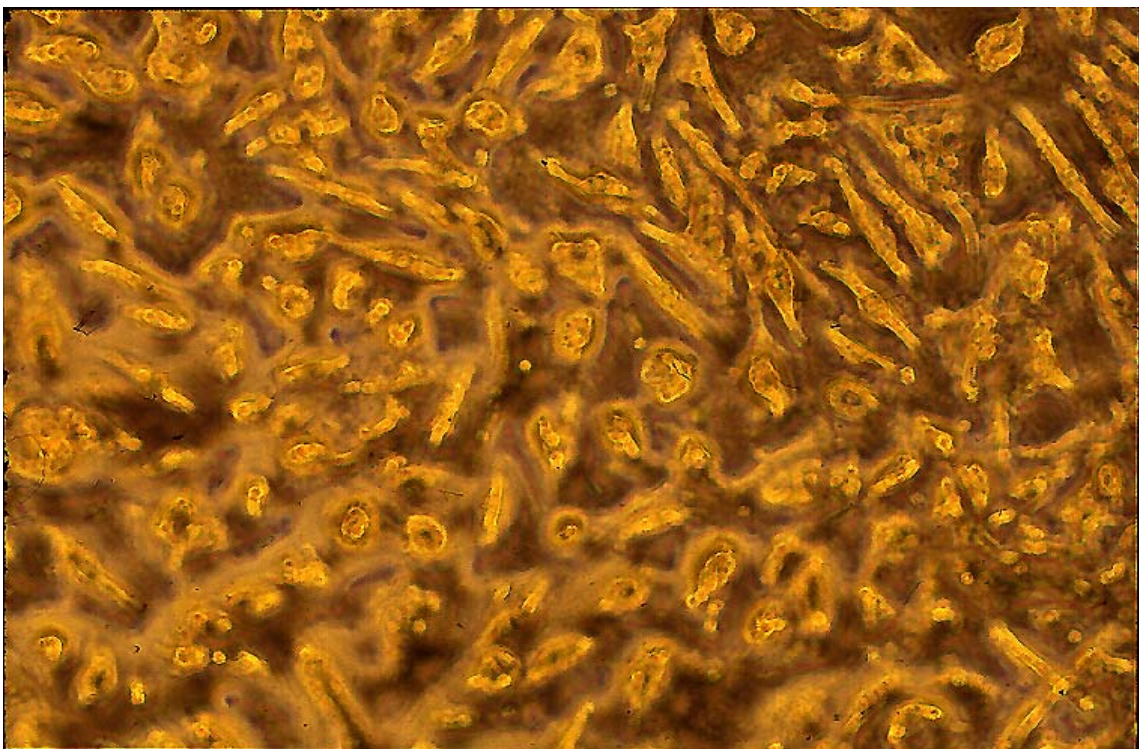


Abb. 17: Proximale Tubuluszellen bei Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV

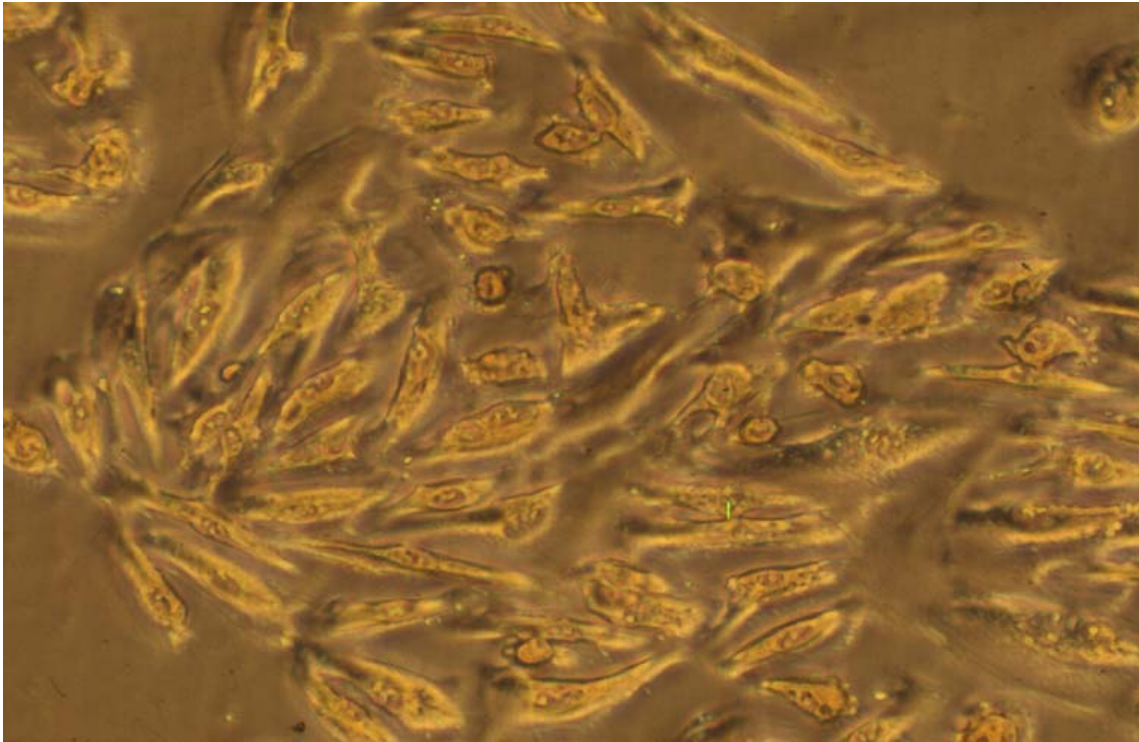


Abb. 18: Proximale Tubuluszellen bei Färbung auf γ Glutamyl-Transferase

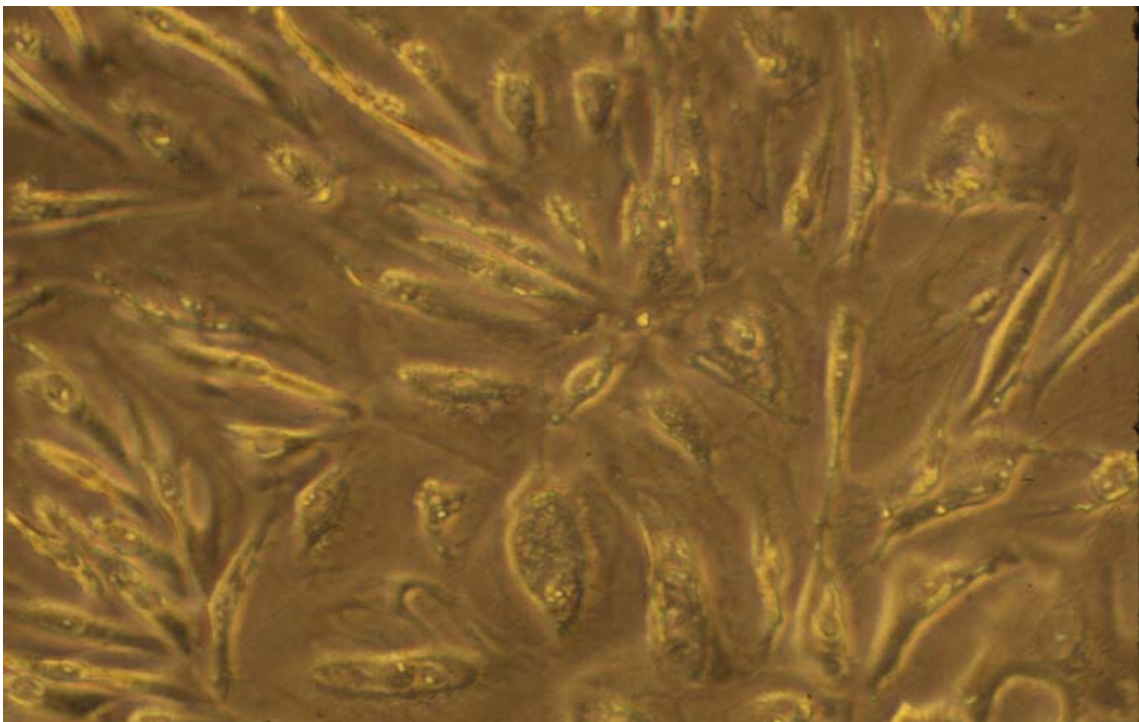


Abb. 19: Proximale Tubuluszellen ohne Färbung

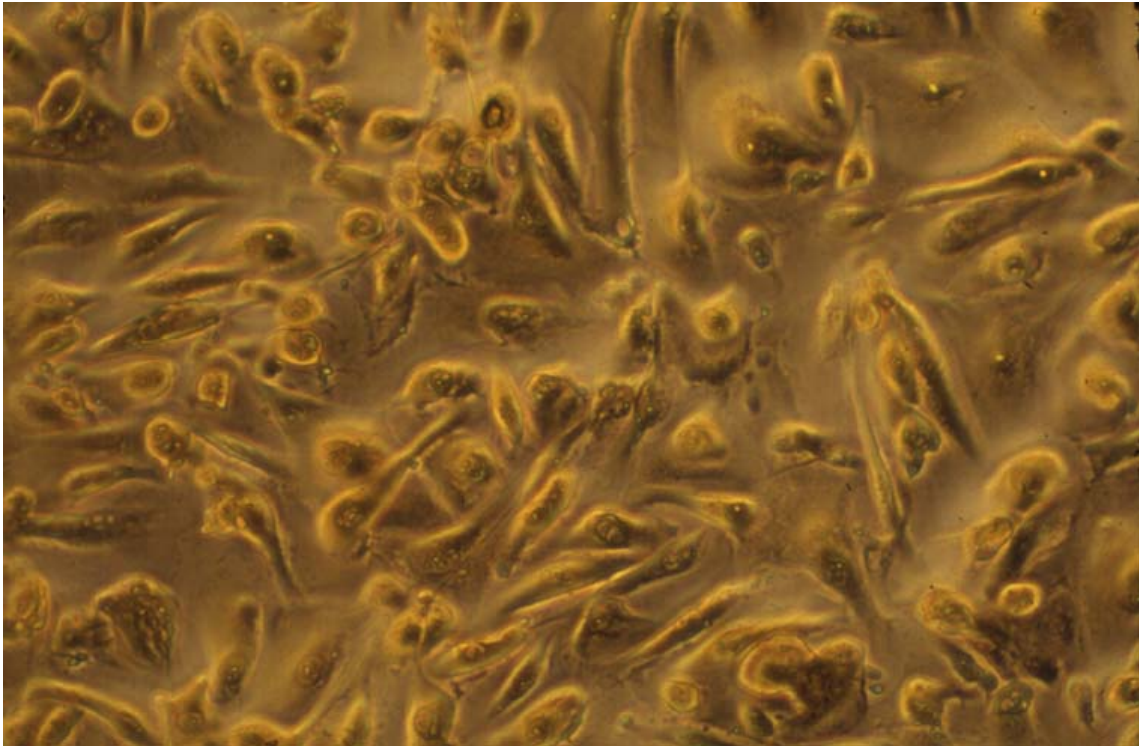


Abb. 20: Distale Tubuluszelle bei Färbung auf Aminopeptidase M

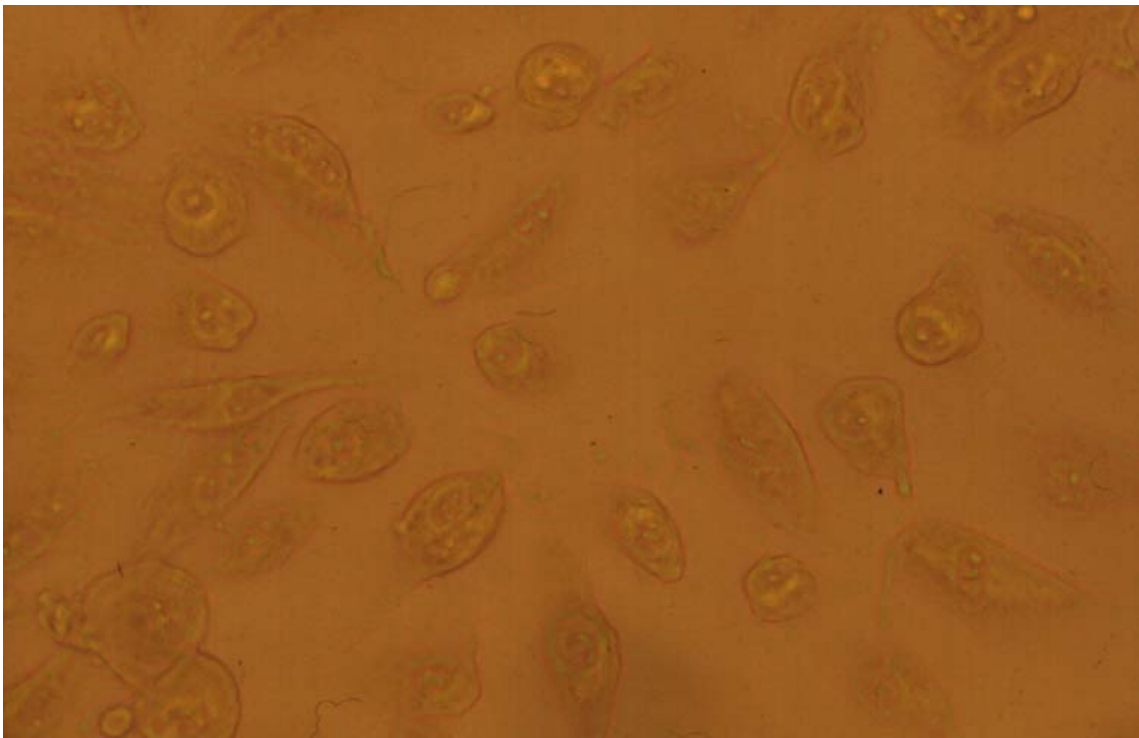


Abb. 21: Distale Tubuluszellen bei Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV

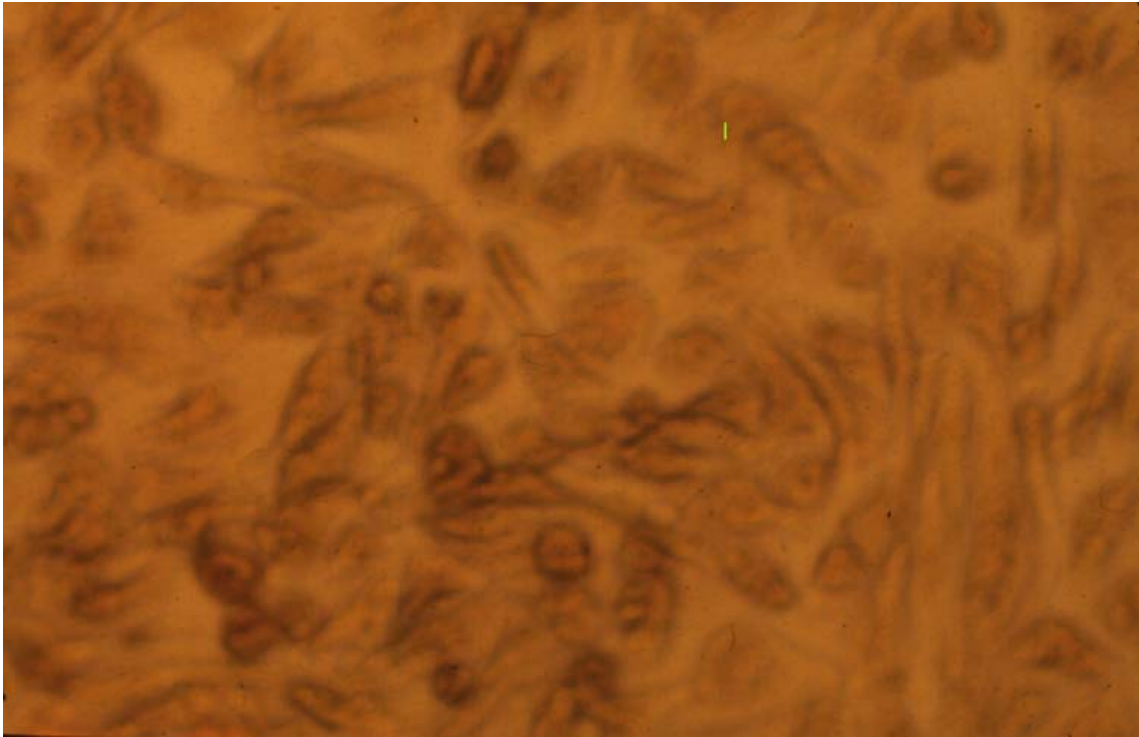


Abb. 22: Distale Tubuluszellen bei Färbung auf γ Glutamyl-Transferase

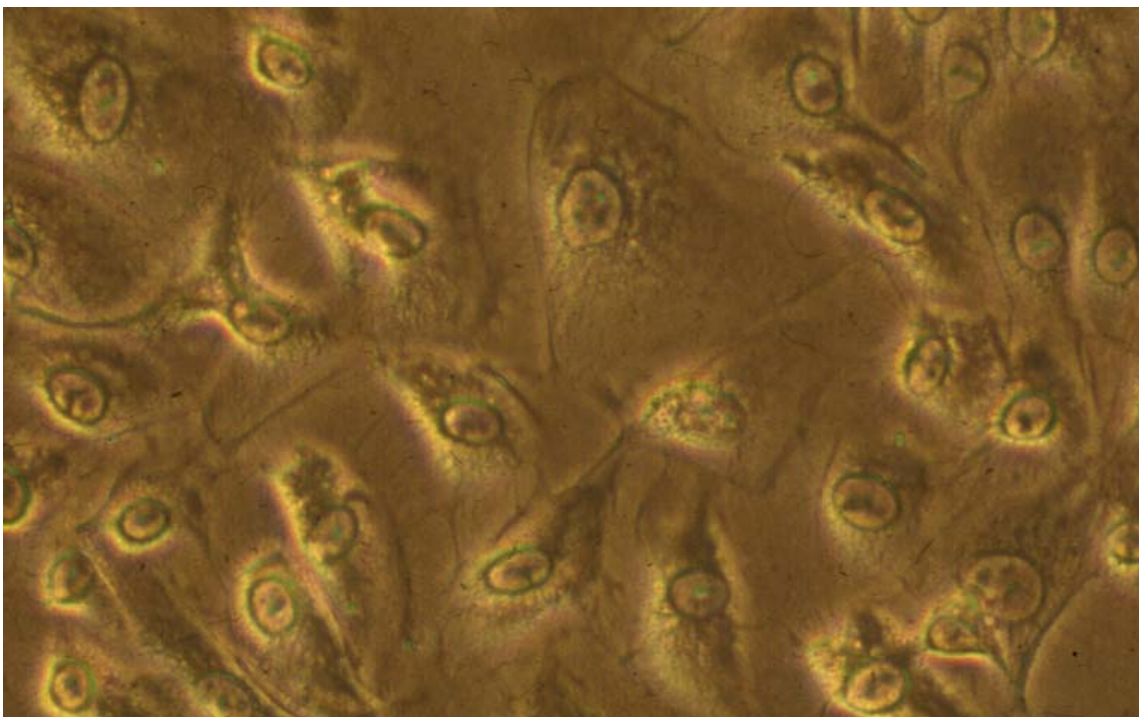


Abb. 23: Distale Tubuluszellen ohne Färbung

4.5.4 Einbettung und Elektronenmikroskopie

Am sechsten Tag einer Primärkultur wurden, nach Fixierung und Einbettung, elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

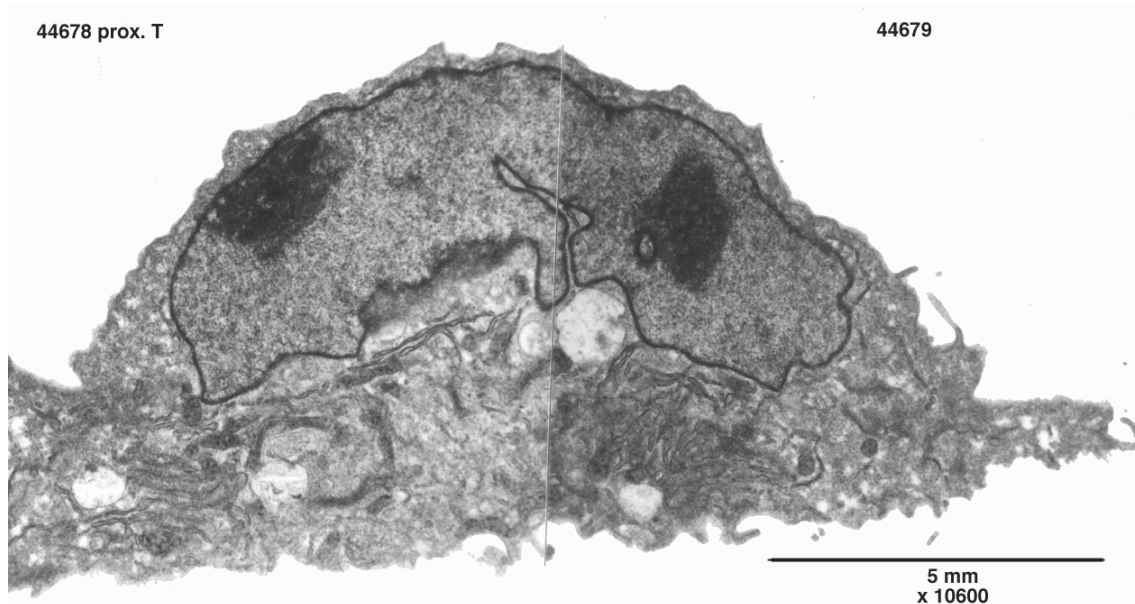


Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer proximaler Tubuluszelle



Abb. 25: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer distalen Tubuluszelle

5 Diskussion

Seite 51

5 Diskussion

Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Etablierung einer Methode zur Isolierung und Kultivierung proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere. Besondere Beachtung fand dabei die Reinheit der Kulturen und eine möglichst hohe Zellausbeute. Dies ermöglicht den Aufbau eines in-vitro-Modellsystems mit der Möglichkeit zu Versuchen über Struktur und Funktion proximaler und distaler Tubuluszellen. In weitergehenden Versuchen kann dann der Einfluß von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Pharmaka, oder zellschädigenden Agentien etc. getestet werden.

Aussagen über Oberflächenantigene, Enzymverteilungen, Hormonwirkungen, Antibiotikawirkungen etc., in der Niere können durch Experimente an Nierenschnitten, Tubulussuspensionen, mikrodissoziierten Tubuli oder Einzelzellen gewonnen werden. Nur mit homogenem Ausgangsmaterial gelingt jedoch eine exakte Zuordnung der jeweiligen Ergebnisse zu der entsprechenden morphologischen Einheit. Prinzipiell können zur Trennung von Zellen Größenunterschiede (Trifillis et al., 1984), Dichteunterschiede (McLay, et al., 1994), oder verschiedene Oberflächenantigene (van der Biest et al., 1994) verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Möglichkeiten zur Trennung und ein immunomagnetisches Separationsverfahren miteinander kombiniert um Tubuluszellen in hoher Reinheit zu erhalten. In vielen Arbeiten wird die Separation proximaler und distaler Tubuluszellen beschrieben. Jedoch stellte die Reinheit der Zellen und die Zellzahl fast immer ein Problem dar.

So isolierten Trifillis et al. 1984 mittels enzymatischer Andauung und anschließendem mehrmaligen Filtern über Nylonsiebe, mit unterschiedlicher Porengröße, menschliche Tubuluszellen. Dabei lag die Anzahl der lebenden Zellen in dem primär Isolat zwischen 25 und 61 Prozent. Durch anschließende Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde eine Zuordnung zu den entsprechenden Nephronabschnitten getroffen. Hohe Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase lieferte den Beweis für die Zugehörigkeit der Zellen zum Bürstensaum des proximalen Tubulus.

Durch reine enzymatische Andauung und leichte mechanische Behandlung gewannen Kempson et al. 1988 Tubuluszellen der menschlichen Nierenrinde. Die Anzahl der so gewonnen Zellen lag bei $5 \cdot 10^4$ pro Kulturflasche. Dabei gewannen sie eine heterogene Zellkultur mit überwiegend epithelialen Zellen. Diese Zellkultur wurde charakterisiert durch Bestimmung von Stofftransport-Eigenschaften, durch Hormon stimulierte Antworten, endocytotische Aktivität, Enzymaktivitäten und elektronenmikroskopische Aufnahmen. Dabei zeigten sich überwiegend Charakteristika von proximalen Tubuluszellen. Die Zellen zeigten eine durch Parathormon Stimulierung signifikante Zunahme der cAMP Produktion. Außerdem produzierten die Zellen die Enzyme Maltase, Leucin-Aminopeptidase, und Gamma-Glutamyl-Transferase.

Mittels Immunodissektion gewannen Smith et al 1985 eine Kultur bestehend aus Sammelrohrzellen der Hundeniere. Um die Immunodissektion erfolgreich durchführen zu können muß eine Einzelzell Suspension des Nierengewebes vorliegen. Dazu wurden die Erythrozyten lysiert, und die restlichen Zellen mehrmals durch Stahlsiebe der Porengröße 0,25mm filtriert. Die Einzellzellsuspension wurde nun auf, mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Gewebe-Kultur-Platten aufgetragen. Die Inkubationszeit sollte dabei möglichst kurz sein, um die Bindung nicht spezifisch bindender Zellen, wie z B. Fibroblasten zu minimieren. Die Zellmorphologie wurde anschließend unter dem Elektronenmikroskop beurteilt. Die isolierten Zellen wurden außerdem histochemisch auf ihre Markerenzyme gefärbt. Diese Färbung wurde auch auf Gefrierschnitten der Niere durchgeführt. Als Antwort auf eine Stimulation der Zellen mit Arginin, Vasopressin, und Isoproterenol fand sich eine verstärkte cAMP Produktion.

Durch Gebrauch eines serumfreien Mediums stellten Detrisac et al. 1984 eine Gewebekultur menschlicher Nierenepithelzellen her. Dazu wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert auf eine Teilstückgröße von 1mm^3 . Anschließend wurden die Gewebestücke in eine Kulturflasche überführt, diese wurde für 30 Minuten auf den Kopf gestellt, dann wurde serumfreies Medium zupipettiert, und die Kulturflasche wieder umgedreht. Durch spezielle Zusätze wurde das Wachstum von Fibroblasten minimiert und das Wachstum der Nierenepithelzellen gefördert. Die anschließende enzymhistochemische Untersuchung der kultivierten Zellen im Vergleich zur

enzymhistochemischen Untersuchung auf Gefrierschnitten der menschlichen Niere, zeigte ein Überwiegen von proximalen Tubuluszellen in der Zellkultur. Durch hohe Aktivität an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde der Beweis zur Zugehörigkeit der Zellen zum proximalen Tubulus geführt. Allerdings fanden sich auch Aktivitäten der Enzyme Karboanhydrase, 5' Nucleotidase und saure Phosphatase welche unter anderem im Glomerulum, distalen Tubulus und in den Sammelrohren zu finden sind. Bei Untersuchung der Ultrastruktur fanden sich 4-6 Zellen um ein zentrales Lumen gruppiert. Der Zusammenhalt erfolgte mittels Schlußleistenkomplexen, bestehend aus Zonula occludens, Zonula adherens, und Desmosomen. Die dem Lumen zugewandten Zellen zeigten kurze Mikrovilli.

Durch Mikrodissektion menschlicher Nierenrinde erhielten Wilson et al. 1985 Microschnitte des gewundenen proximalen Tubulus, des geraden Teils des proximalen Tubulus, des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife, und Microschnitte des Sammelrohres. Dazu wurden Präzisionsinstrumente von Uhrmachern verwendet. Auf eine enzymatische Andauung wurde verzichtet. Verschiedene Schnitte wurden mit unterschiedlichen Medien inkubiert. Zur Charakterisierung der Zellen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, Enzymaktivitäten gemessen, und die Adenylatcyclase-Aktivität, basal, und in Abhängigkeit von Hormonen gemessen. Dabei zeigten die Zellen des geraden Teils des proximalen Tubulus eine hohe Aktivität der Enzyme Alkalische Phosphatase und Gamma-Glutamyl-Transferase. Der gewundene Teil des proximalen Tubulus zeigte hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase, aber keine Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase. Die Zellen des proximalen Tubulus zeigten in ihrer Gesamtheit bei der Elektronenmikroskopie lange, an der spitze gelegene Mikrovilli, zahlreiche Mitochondrien, und rauhes endoplasmatisches Reticulum, Ribosomen und aktive Golgi-Apparate. Die Adenylatcyclase-Aktivität zeigte bei Zellen des proximalen Tubulus eine Stimulierbarkeit durch Parathormon. Allerdings waren die durch Mikrodissektion gewonnenen Zellkulturen der einzelnen Nierenrindenschnitte nie völlig frei von anderen Zellen, wie z.B. Fibroblasten. Eine Aussage über die Zellzahl einer durch Mikrodissektion gewonnenen Zellkultur wurde nicht gemacht.

Eine weitere Möglichkeit Nierenzellen eines definierten Ursprungs zu erhalten, besteht in den existierenden, immortalisierten Zelllinien. Dazu gehören die Madine-Darby-Canine-Kidney (MDCK) Zellen (Milton H. Saier 1981) und die LLC-PK Zellen (Misfeldt 1981). Außerdem existiert eine immortalisierte Zelllinie von proximalen Tubuluszellen der menschlichen Niere (Ryan et al. 1994). Diese immortalisierten Zelllinien haben den Vorteil, das die, für ein Experiment benötigte Zellzahl kein Problem darstellt. Jedoch verlieren diese Zelllinien durch die Transformation charakteristische biochemische und physikalische Eigenschaften, und nehmen andere Eigenschaften an (van der Biest 1994). Dadurch haben insbesondere Primärkulturen, aber auch subkultivierte Zellen einen Vorteil gegenüber immortalisierten Zelllinien.

Alle beschriebenen Möglichkeiten zur Gewinnung einer homogenen Nierenzellkultur zeigen Probleme bei der Reinheit der Zellen und oder der Zellzahl. In dieser Arbeit wurden daher um eine reine Zellpopulation in ausreichender Anzahl zu erhalten, mehrere Isolationsschritte und Separationsverfahren verwendet. Dabei wurde zuerst eine mechanische Zerkleinerung angewandt, um eine möglichst große Angriffsfläche für die nachfolgende enzymatische Andauung zu schaffen. Ein entscheidender Faktor bei der Gewinnung proximaler und distaler Tubuluszellen waren die eingesetzten Enzyme. Diese verschiedenen Enzyme wurden in unterschiedlicher Kombination und Konzentration getestet, um ein Enzymgemisch zu erhalten, welches eine möglichst schonende Andauung mit Gewinnung einer ausreichenden Zellzahl ermöglichte. Der Einsatz von hochkonzentriertem Trypsin lieferte zwar eine sehr hohe Zellausbeute, jedoch zeigte sich bei der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene eine deutlich geringere Fluoreszenz als bei anderen Enzymen. Die starke Protease Trypsin veränderte offensichtlich die Oberflächenantigene oder zerstörte sie (Petrasch et al. 1990).

Anschließend wurde die so gewonnene Zellsuspension auf einen sich selbst generierenden Percoll-Dichtegradienten gegeben und zentrifugiert. Der Dichtebereich zwischen 1,045 und 1,07 g/ml wurde abpipettiert. In diesem Bereich fanden van der Biest et al. 1994 die stärkste Färbung auf das Enzym Gamma-Glutamyl-Transferase. Jedoch befinden sich in diesem Bereich noch zahlreiche andere Zellen.

Die zur Separation der Zellen eingesetzten mit dem MAK 138H11 und dem MAK 5A2 beschichteten Antikörperplatten zeigten ein starkes Anheften von nicht spezifischen Zellen. Die Anzahl proximaler und distaler Tubuluszellen auf den beschichteten Antikörperplatten betrug 30-40%. Besonders das Anheften von Fibroblasten konnte nicht verhindert werden (Smith et al. 1985).

In dieser Arbeit wurden zwei immunomagnetische Verfahren zur Separation proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere durchgeführt. Als Primärantikörper wurden wieder der MAK 138H11, gerichtet gegen Gamma-Glutamyl-Transferase und der MAK 5A2, gerichtet gegen Tamm-Horsfall Protein, verwendet. Mit einem gegen Gamma-Glutamyl-Transferase gerichteten MAK isolierten van der Biest et al. 1994 reine proximale Tubuluszellen der menschlichen Niere. Der von ihnen zur Isolierung distaler Tubuluszellen verwendete MAK war gegen humanes Milhfett gerichtet. Damit isolierten sie eine heterogene Zellpopulation aus distal liegenden Anteilen des Nephrons. Der in dieser Arbeit zur Isolierung distaler Tubuluszellen verwendete MAK 5A2, hat den Vorteil, das das Tamm-Horsfall Protein nur im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife und im distalen Tubulus nachgewiesen wurde (Truong-LD 1994). Anschließend wurden die Zellen, mit Dynabeads oder Microbeads markierten Sekundärantikörpern inkubiert, welche die monoklonalen Primärantikörper erkannten.

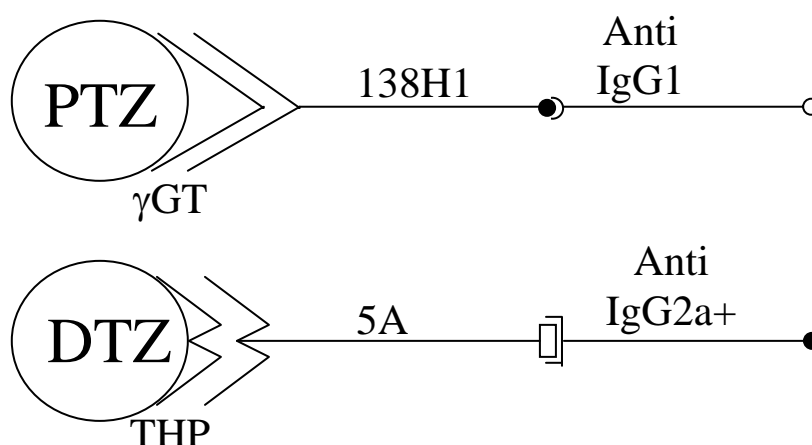


Abb. 26:

Schematische Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion

Anschließend erfolgte die Separation im magnetischen Feld. In einer Trennsäule, welche mit einer eisenmagnetischen Matrix bedeckt ist, werden die markierten Zellen zurückgehalten (Miltenyi et al. 1990). Es war nicht möglich die mit den Dynabeads separierten Zellen mit der Immunfluoreszenzfärbung zu beurteilen, da die Dynabeads eine Eigenfluoreszenz zeigten. Daher konnte die Reinheit der separierten Zellen nicht ermittelt werden. Da die Größe der Microbeads wesentlich geringer war, und diese auch keine Eigenfluoreszenz in der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung zeigten, war es möglich die Reinheit der Zellen zu ermitteln. Die Microbeads, mit einer Größe von 50-150 nm beeinträchtigen die Oberflächenstruktur der Zellen nicht. Die Partikel werden kurze Zeit später von den Zellen phagozytiert. Dieses immunomagnetische Separationsverfahren wurde bisher besonders zur Isolierung von Blutzellen (Monozyten, Granulozyten etc.) verwendet (Schmitz et al. 1993, Pflüger et al. 1990). In dieser Arbeit wurde das Verfahren erstmals zur erfolgreichen Isolierung proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere eingesetzt. Durch diese Methode wurden für proximale und distale Tubuluszellen jeweils durchschnittlich $1-2 \cdot 10^6$ Zellen /ml gewonnen. Der Anteil der lebenden Zellen betrug 85%. Bei der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich im Vergleich Durchlicht zu Fluoreszenz eine Markierung nahezu aller Zellen (95%).

In weiterführenden Arbeiten wurden mit dieser Methode distale Tubuluszellen der menschlichen Niere isoliert und monoklonale Antikörper gegen distale Tubuluszellen entwickelt (Dissertation Günzel 1996). Außerdem wurden proximale und distale Tubuluszellen mit dieser Methode isoliert und weiter charakterisiert (Baer et al. 1997). Dabei wurden Enzymaktivitäten der Tubuluszellen ebenso bestimmt wie die cyclische AMP Produktion nach Hormonstimulation. Auch hier zeigte sich eine charakteristische Verteilung der Enzyme bei den proximalen Tubuluszellen.

Die anschließende Kultivierung der Zellen zeigte ab dem 7-10 Tag die Bildung eines homogenen Monolayers. Sowohl distale als auch proximale Tubuluszellen zeigten eine mittlere Überlebensdauer von ca. 30 Tagen. Diese Ergebnisse werden auch in vielen anderen Arbeiten beschrieben (Trifillis et al. 1984, van der Biest et al. 1994, Wilson et al. 1985). Bei proximalen und distalen Tubuluszellen war gegen Ende der Lebenszeit eine starke Granulation des Zytoplasmas zu sehen. Die Zellen stellten das Wachstum ein und starben ab. In vielen Arbeiten wurde bei der Isolierung der Nierenzellen hohe

Konzentrationen von Antibiotika verwendet (Kempson et al. 1988, Trifillis et al. 1984, Wilson et al. 1985). In dieser Arbeit gelang es durch streng steriles Bearbeiten der Zellen, diese für die gesamte Lebensdauer der Kultur ohne Kontamination mit Bakterien oder Pilzen zu halten.

Bei der nachfolgenden Charakterisierung der Zellen durch Enzymbestimmungen im Überstand zeigte sich bei den proximalen Tubuluszellen deutlich höhere Konzentrationen von Gamma-Glutamyl-Transferase, und Aminopeptidase M, als bei den distalen Tubuluszellen. Sowohl die Gamma-Glutamyl-Transferase als auch die Aminopeptidase M sind charakteristische Markerenzyme des proximalen Tubulus (Scherberich et al. 1984, Guder et al. 1984). Die Alkalische Phosphatase dagegen war bei den proximalen Tubuluszellen nur geringfügig erhöht gegenüber den distalen Tubuluszellen. Lokalisiert ist die Alkalische Phosphatase vor allem im proximalen Tubulus, aber auch in den Glomerula, Sammelrohren und im distalen Tubulus (Guder et al. 1984). Die Messung der Dipeptidylpeptidase IV, eine membranständige Endopeptidase welche im Bürstensaum der menschlichen Niere lokalisiert ist, zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen proximalen und distalen Tubuluszellen. Die Enzymbestimmungen zeigten im zeitlichen Verlauf teilweise abnehmende, und teilweise zunehmende Konzentrationen der Enzyme. Nur bis zum 7 Tag behielten die proximalen und distalen Tubuluszellen ihr charakteristisches Enzymprofil. Die immunhistochemische Bestimmung proximaler und distaler Tubuluszellen auf der 96-Well Platte, zeigte nach elf Tagen Kultivierung ein nahezu gleiches Enzymprofil beider Zellarten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die in Kultur gehaltenen Zellen charakteristische Eigenschaften verlieren und unspezifische dazugewinnen. Es findet eine Entdifferenzierung statt. Dies entspricht weitgehend den Ergebnissen anderer Arbeiten (van der Biest et al. 1994, Trifillis et al. 1984). Auch eine Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenantigene proximaler (Gamma-Glutamyl-Transferase) und distaler (Tamm-Horsfall-Protein) Tubuluszellen zeigte nach 14 Tagen Kulturdauer ein Verlust der spezifischen Oberflächenantigene.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der proximalen und distalen Tubuluszellen, nach sechs Tagen Kultivierung, zeigten bei beiden Zellarten eine Verringerung der Anzahl der Mikrovilli. Deutlich erkennbar sind die kurzen dicken Mikrovilli bei den distalen Tubuluszellen. Bei den proximalen Tubuluszellen sieht man nur vereinzelt

lange und dünne Mikrovilli. Die Zellen des proximalen Tubulus zeigen eher in Reihen angeordnete längliche Mitochondrien, wohingegen bei den Zellen des distalen Tubulus rund bis ovale Mitochondrien zu sehen sind.

Sowohl proximale als auch distale Tubuluszellkulturen der menschlichen Niere verloren in dieser Arbeit nach ca. sieben Tagen ihre charakteristischen Eigenschaften und gewannen neue unspezifische hinzu. Daher müssten weitergehende Arbeiten, über die biochemischen und physikalischen Eigenschaften proximaler und distaler Tubuluszellen, innerhalb dieses Zeitraumes durchgeführt werden. Nur so würde man ein genaues Abbild der in vivo lebenden Zellen erhalten.

6 Zusammenfassung

Seite 59

6 Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Isolierung und Kultivierung proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere. Dabei wurde neben einer hohen Zellausbeute besonderer Wert auf die Reinheit der Nierenzellkulturen gelegt. Um dieses Ziel zu erreichen wurden mehrere Isolationsschritte hintereinander durchgeführt. Um eine homogenen Zellsuspension aus dem Nierenexzisat zu erhalten wurde eine mechanische Zerkleinerung und anschließend eine enzymatische Andauung durchgeführt. Dabei war ein Enzymgemisch aus Collagenase IV und DNase I mit nachfolgender Andauung mit Hyaluronidase am erfolgreichsten. Um größere Zellverbände auszuschließen wurde das Zellgemisch anschließend durch ein Stahlsieb filtriert. Durch die Percoll Dichtegradientenzentrifugation konnten die Zellen in einem weiteren Schritt separiert werden. Dadurch konnten z.B Erythrozyten, Granulozyten und ein Teil der Lymphozyten verworfen werden. Durch die unterschiedliche Antigenstruktur der Oberflächenmembran proximaler und distaler Tubuluszellen konnten mit Hilfe von monoklonalen Primär und Sekundärantikörpern, welche magnetisch markiert waren, die proximalen und distalen Tubuluszellen separiert werden. Mit Hilfe dieses immunomagnetischen Verfahrens wurden erstmals proximale und distale Tubuluszellen der menschlichen Niere in hoher Reinheit und Vitalität isoliert. Damit zeigte sich dieses Verfahren, welches bisher fast ausschließlich zur Isolierung von Blutzellen eingesetzt wurde, auch bei der Isolierung von Tubuluszellen der menschlichen Niere als erfolgreich. Die zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellisolierung eingesetzte Immunfluoreszenzfärbung zeigte, im Vergleich zum Durchlicht, nach der Percoll Dichtegradientenzentrifugation eine Markierung von ca. 30% der Zellen. Nach der Separierung der Zellen durch die Microbeads waren fast alle Zellen (95%) markiert. Die sich anschließende Kultivierung proximaler und distaler Tubuluszellen zeigte ein einheitliches Wachstumsmuster. Beide Zellarten zeigten nach 3-4 Tagen die Bildung kleiner Kolonien, und nach 7-10 Tagen die Bildung eines homogenen Monolayers. Nach ca. 20 Tagen zeigten die Zellen eine stärker werdende Granulierung des Zytoplasmas. Nach ca. 30 Tagen stellten die Zellen das Wachstum ein und starben ab. Um die Kulturen der proximalen und distalen Tubuluszellen zu charakterisieren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Immunfluoreszenzfärbungen, und Enzymbestimmungen

im Überstand und auf den Zellen direkt durchgeführt. Dabei konnten die charakteristischen Enzymmuster und Oberflächenantigene nur für eine Zeitspanne von ca. 7 Tagen in Kultur nachgewiesen werden.

7 Literaturverzeichnis

Seite 61

7 Literaturverzeichnis

Bear Patrick C., Nockher Wolfgang A., Hasse Winfried, Scherberich Jürgen E.
Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation
Kidney International Vol. 52 (1997), pp. 1321-1331

Bauer Dietrich R.
Physiologie der Niere
Palm & Enke Verlag Erlangen 1991

Birk H.-W., Ogiermann M., Altmannsberger M., Schütterle G., Haase W., Koepsell H.
Monoclonal antibodies against luminal membranes of renal proximal tubules which are kidney specific.
Biochimica et Biophysica Acta 1148 (1993) 67-76

Boehringer Mannheim
Cell Biology. Enzymes for tissue dissociation. Applications Manual

Bohle Adalbert
Die Niere: Struktur und Funktion
Schattauer Verlag 1984

Classen M. (Hrsg.)
Innere Medizin
Urban und Schwarzenberg 1993

Detrisac C.J., Sens M.A., Spicer S.S., Sens D.A.
Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin.
Kidney international, Vol. 25 (1984), pp. 383-390

Donati R., Sabolovic N., Wellmann M., Artur Y., Siest G.

Monoclonal antibodies to human kidney gamma-glutamyl-transferase

Clinica Chimica Acta 174 (1988) pp. 149-162

Frank Jürgen

Analyse der Interaktionen renaler Epithelzellen mit interstitiellen Fibroblasten und deren Bedeutung für die Pathogenese der interstitiellen Nierenfibrose

Dissertation Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1993)

Garcia-Perez A., Smith W.L.

Use of monoclonal antibodies to isolate cortical collecting tubule cells: AVP induces PGE release.

Am. Journal of Physiology 244 (Cell Physiol. 13) C211-C220, 1983

Gibson-D`Ambrosio R.E., Samuel M., Chang C.C., `Trosko J.E., D `Ambrosio M.D.

Characteristics of long-term human epithelial cell cultures derived from normal human fetal kidney.

Tissue Culture Vol. 23 Number 4 1987 pp. 279-287

Gilbert S.F., Migeon B.R.

D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cell in culture.

Cell, Vol. 5, 11-17 May 1975

Guder W.G., Ross B.D.

Enzyme distribution along the nephron

Kidney International, Vol. 26 (1984) pp.101-111

Kempson S.A., McAteer J.A., Al-Mahrouq H.A., Dousa T.P., Dougherty G.S., Evan A.P.

Proximal tubule characteristics of cultured human renal cortex epithelium.

J. . Clin. Med., Vol. 113 Number 3 March 1989

Köpfer-Hobelsberger Barbara

Zur Isolierung von Zellpopulationen aus Niere: Darstellung, Auftrennung und Charakterisierung von Zellen aus dem proximalen und distalen Nephron der Kaninchenniere.

Inaugural-Dissertation München 1982

McLay J., Chatterjee P., Nicolson G., et al.

Nitric oxide production by human proximal tubular cells: A novel immunomodulatory mechanism ?

Kidney International, Vol. 46 (1994) pp. 1043-1049

Miltenyi S., Müller W., Weichsel W., Radbruch A.

High gradient magnetic cell separation with MACS
Cytometry 11: 231-238 (1990)

Mondorf W.A., Scherberich J.E.

Die normale Niere Bildatlas

Friedr. Vieweg & Sohn Braunschweig/Wiesbaden

Netter Frank H.

Niere und Harnwege

Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1983

Ong A.C.M., Jowett T.P., Moorhead J.F., Owen J.S.

Human high density lipoproteins stimulate endothelin-1 release by cultured human renal proximal tubular cells

Kidney International, Vol. 46 (1994) pp. 1315-1321

Parcyk J., Urban J., Ullrich O., Hartmann K., Rauch J., Kondor-Koch C.

Zellkulturen als Modell für Nierenfunktionen

Biotechnica Hannover 17. - 19. 10. 1989

Petrasch S., Perez-Alvarez C., Schmitz J., Kosco M., Brittinger G.

Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from nonmalignant and malignant lymphatic tissue.

Eur. J. Immunol. 1990; 20: 1013-1018

Pharmacia

Percoll Methodology and applications. Density Marker Beads. For calibration of gradients of Percoll.

Pharmacia Uppsala-Sweden, 1985

Ryan M.J., Johnson G., Fuerstenberg S.M., Zager R.A., Torok-Storb B.

HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney.

Kidney International, Vol. 45 (1994) pp. 48-57

Saier, Milston H., Jr.

Growth and differentiated properties of a kidney epithelial cell line (MDCK).

Am. J. Physiol. 240 (Cell Physiol. 9) C106-C109, 1981

Scherberich J.E., Mondorf A.W., Schoeppe W.

Immundiagnostik tubulärer Zellschäden der Niere mit Hilfe spezifischer Antimembran-Antikörper.

Immun. Infekt. 12, 229-237 (1984)

Scherberich J.E., Wolf G.B., Mauck J.W., Hess H.

Charakterisierung von Membranantigenen der Humanniere und des Nierenadenokarzinoms.

Immun. Infekt. 12, 267-278 (1984)

Smith W., Garcia-Perez A.

Immunodissection: use of monoclonal antibodies to isolate specific types of renal cells.

Am. J. Physiol. 248 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 17): F1-F7, 1985

Schmitz J., Petrasch S., Van Lunzen J., Racz P., Kleine H.-D. et al.

Optimizing follicular dendritic cell isolation by discontinuous gradient centrifugation and use of the magnetic cell sorter (MACS).

Journal of Immunological Methods 159 (1993) pp. 189-196

Stefanovic V., Ardaillou N., Vlahovic P. et al.

Interferon-gamma induces dipeptidylpeptidase IV expression in human glomerular epithelial cells.

Immunology 1993 Vol. 80 pp. 465-470

Trifillis A.L., Regec A.L., Trump B.F.

Isolation culture and characterization of human renal tubular cells.

J. of Urol. 133 (1985) pp. 324-329

Truong-LD, Ostrowski-ML, Wheeler-TM

Tamm-Horsfall protein in bladder tissue. Morphologic spectrum and clinical significance.

Am. J. Surg. Pathol. June (1994) 18(6): 615-622

Valtin Heinz

Funktion der Niere

Schattauer Verlag Stuttgart

Van der Biest I., Nouwen E.J., Van Dromme S.A.

Characterization of pure proximal and heterogeneous distal human tubular cells in culture.

Kidney International, Vol. 45 (1994) pp.85-94

Wilson P.D., Dillingham M.A., Breckon R., Anderson R.J.

Defined human renal tubular epithelia in culture: growth, characterization, and hormonal response.

Am. J. Physiol. 248 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 17): F436-F443, 1985

8 Abbildung

Abb. 1:

Übersicht über den Stofftransport im Tubulus und im Sammelrohr.

Schwarze Pfeile bedeuten aktiven, nicht ausgefüllte Pfeile passiven Transport. Seite 2

Abb. 2:

Grafische Darstellung von einigen der ultrastrukturellen Unterschiede zwischen den größeren Abschnitten des Nephrons. Außerdem ist der juxtaglomeruläre Apparat dargestellt, der sich an dem Berührungspunkt zwischen distalem Tubulus und dem Gefäßpol des ihm zugehörigen Glomerulums befindet.

Seite 6

Abb. 3:

Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der indirekten immunomagnetischen Separation tubulärer Epithelien der menschlichen Niere (siehe 3.3.5.2).

Seite 24

Abb. 4:

Proximale Tubuluszellen im Größenvergleich zum Erythrozyt

Seite 33

Abb. 5:

Distale Tubuluszellen im Größenvergleich zum Erythrozyt

Seite 33

Abb. 6:

Eichkurve Verteilung der Dichtebereiche der distalen und proximalen Tubuluszellen über den Percoll Dichtegradienten

Seite 34

Abb. 7:

Dichtebereiche der einzelnen Blutzellen im Vergleich zum Dichtebereich proximaler und distaler Tubuluszellen

Seite 35

Abb. 8:

Proximale Tubuluszellen unmittelbar nach der Separierung

Seite 38

Abb. 9:

Proximale Tubuluszellen am siebten Tag nach der Aussaat

Seite 38

Abb. 10:

Proximale Tubuluszellen am vierzehnten Tag nach der Aussaat

Seite 39

Abb. 11:

Proximale Tubuluszellen am einundzwanzigsten Tag nach der Aussaat Seite 39

Abb. 12:

Distale Tubuluszellen unmittelbar nach der Separierung Seite 40

Abb. 13:

Distale Tubuluszellen am siebten Tag nach der Aussaat Seite 40

Abb. 14:

Distale Tubuluszellen am vierzehnten Tag nach der Aussaat Seite 41

Abb. 15:

Distale Tubuluszellen am einundzwanzigsten Tag nach der Aussaat Seite 41

Abb. 16:

Proximale Tubuluszelle bei Färbung auf Aminopeptidase M Seite 46

Abb. 17:

Proximale Tubuluszellen bei Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV Seite 46

Abb. 18:

Proximale Tubuluszellen bei Färbung auf γ Glutamyl-Transferase Seite 47

Abb. 19:

Proximale Tubuluszellen ohne Färbung Seite 47

Abb. 20:

Distale Tubuluszelle bei Färbung auf Aminopeptidase M Seite 48

Abb. 21:

Distale Tubuluszellen bei Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV Seite 48

Abb. 22:

Distale Tubuluszellen bei Färbung auf γ Glutamyl-Transferase Seite 49

Abb. 23:

Distale Tubuluszellen ohne Färbung Seite 49

Abb. 24:

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer proximaler Tubuluszelle Seite 50

Abb. 25:

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer distalen Tubuluszelle Seite 50

Abb. 26:

Schematische Darstellung der Antigen-Antikörperreaktion Seite 55

9 Danksagung

Vielen Dank an alle die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Professor Doktor Scherberich für die freundliche Überlassung des Themas und Herrn Doktor Nockher für die wissenschaftliche Unterstützung beim Durchführen der Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung der Nephrologie die mir mit tatkräftiger und immer freundlicher Unterstützung bei allen labortechnischen Untersuchungen geholfen haben.

Vielen Dank auch an Frau Diana Maager für die computer-technische Beratung und Ausführung.

Ein besonderer Dank auch an meine Familie, die mich in allen Phasen dieser Dissertation unterstützte.

10 Lebenslauf

Seite 69

10 Lebenslauf

Anita Balser-Kutt

Persönliche Angaben

Familienstand:	Ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Geburtsdatum:	03.04.1964
Geburtsort:	Giessen Rödgen
Eltern:	Ernst Balser-Kutt und Isolde Balser-Kutt geb. Fritz
Geschwister:	Pia Balser-Kutt

Schul- und Berufsausbildung, Berufszeiten

1971-1975	Grundschule in Giessen-Rödgen
1975-1983	Gesamtschule, gymnasialer Zweig, in Giessen
1987-1989	Berufsausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin in den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Höchst
1989-1990	Angestellt als Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin im Zentrallabor der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Höchst

Studium

April 1990	Immatrikulation an der medizinischen Fakultät der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
September 1992	Ärztliche Vorprüfung
März 1994	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 1996	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 1997	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufszeiten

März 1998 – August 1999	Angestellt als Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin in der Othopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim in Frankfurt am Main
Seit Februar 2000	Angestellt als Assistenzärztin im Institut für Anästhesie/Intensivmedizin im Klinikum der Stadt Hanau

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Seite 70

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die in dem Fachbereich Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung, proximaler und distaler Tubuluszellen der menschlichen Niere

im Zentrum der Inneren Medizin, Abteilung Nephrologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J.E. Scherberich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 19. Juli 2003